



## TESIS DOCTORAL

***Pseudomonas aeruginosa* en Pacientes con Fibrosis Quística:  
Dinámica Poblacional y Análisis Ecológico según Morfotipo,  
Crecimiento en Biopelículas y Frecuencia de Mutación**

Memoria presentada por **Dña. María del Carmen García Castillo** para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Medicina, Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública y Microbiología.

Directores: Dr. Rafael Cantón y Dra. Rosa del Campo

Madrid, Diciembre 2012





El **Dr. Rafael Cantón Moreno**, Profesor Asociado de la Universidad Complutense de Madrid Facultad de Farmacia y Jefe de Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal.

La **Dra. Rosa del Campo Moreno** Investigador Senior del Hospital Ramón y Cajal.

Por la presente certifican que la memoria titulada “*Pseudomonas aeruginosa* en Pacientes con Fibrosis Quística: Dinámica Poblacional y Análisis Ecológico según Morfotipo, Crecimiento en Biopelículas y Frecuencia de Mutación”, que presenta la doctoranda María del Carmen García Castillo, Licenciada en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid , ha sido realizado bajo su dirección , en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal y reúne, a su juicio, la originalidad y contenidos suficientes para que sea presentada ante el tribunal correspondiente, y optar al Grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que así conste, y para los efectos oportunos, expiden el presente certificado en Madrid a 1 de diciembre de 2012.

Dr. Rafael Cantón Moreno  
Director de la Tesis  
Servicio de Microbiología Hospital Ramón y Cajal  
Ramón y Cajal

Dra. Rosa de Campo Moreno  
Directora de la Tesis  
Servicio de Microbiología Hospital

Dra. María Jesús García García  
Tutora de esta Tesis



**A mis padres**



## Agradecimientos

En primer lugar y muy especialmente me gustaría agradecer a la Dra Rosa del Campo; directora de esta tesis, por enseñarme y apoyarme en momentos de debilidad y sobre todo por estar siempre ahí. Gracias por confiar en mí, amiga.

Al Dr Rafael Cantón, director de esta tesis. Gracias por darme la oportunidad de trabajar con vosotros todos estos años, por abrirme las puertas de una carrera científica por creer y confiar en mí.

Al Dr. Jose Luis Martínez por acogerme durante un año en su laboratorio donde parte de esta tesis comenzó.

A mis amigas del CNB, las cuales ya se han ido marchando a lo largo y ancho del mundo , Patricia ,Ana Ruiz, Elena Seco, Ana Ugidos, Ana Aiastui, Arancha y sobre todo a mi pequeña, gran amiga y “hermana “ Alicia, gracias a todas por hacerme pasar unas risas durante las comidas sentadas en el Campus de la Universidad .

No se me puede olvidar y hacer una mención especial donde empezó todo, en MSD, de mano de Ángela , Antonio ,mi gran amiga Cartu y sobre todo la que me llevó de la mano hasta aquí , Paqui , gracias a todos por quererme aquellos años y confiar en mí.

A mis compañeras de carrera con las cuales mantengo una gran y eterna amistad , “las itas “, Coché, Martita, Mery-one, Tere, Mai, Natalia, Sarita, Teresa , Marta y mi buen amigo Jose Luis. Gracias chicos por acompañame tantos años y que sigamos juntos siempre.

Gracias a todos mis compañeros del Hospital Ramón y Cajal, a residentes, técnicos, personal adjunto y de investigación del servicio de Microbiología, gracias a todos por ponerme siempre una sonrisa agradable.

Mis amigas, ¿Qué puedo decir de ellas?, todo y nada “caspas “ sois la mejor compañía que he tenido en todos estos años y espero que siga siendo así, Esther, Feli, Marisa, Arancha, Carmen, Carol, un beso a todas y gracias.

A José Claudio por su compañía y su saber en los primeros momentos de mi llegada al Hospital, gracias por dejarme un hueco en tu sitio.

A Ana Moreno por estar siempre para charlar un rato de nuestros cosas, gracias por todo.

A todos compañeros del labo Patricia, Elia, Anita, Marta, AnaSofia, Conchi, Tania, Antonio, Irene, Desi, Bea Romero, Aida y Merche gracias por estar ahí desde hace tanto tiempo por ayudarme con alguna duda y por darme ánimos para seguir adelante.

A la Unidad de Fibrosis Quística, Lucrecia, Luis, Adelaida, Marta y Marta Muñoz por ayudarme a entender mejor lo que supone esta enfermedad.

A mis padres, sin vuestra ayuda no habría llegado hasta aquí, gracias por animarme a estudiar, por vuestros ánimos y cariño durante todos estos años. Os quiero.

A todos los que de una manera u otra se han cruzado por mi camino durante estos años y me han apoyado.

A Juanji, gracias por estar ahí desde hace tanto tiempo, tu me has visto crecer personal e intelectualmente, tantos años juntos hacen que sobren las palabras, gracias por apoyarme incondicionalmente en todas las decisiones que he tomado en mi vida y gracias por formar el pilar más importante de mi vida.

A Víctor y Alejandra por ser quien sois, os quiero.



# Índice

---



## INTRODUCCIÓN

1. Fibrosis Quística	3
1.1- Manifestaciones clínicas y criterios diagnósticos	7
1.2- Colonización/infección pulmonar	8
1.3- Progresión temporal de la colonización/infección	9
2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
2.1-Factores de virulencia	15
2.2- Resistencia antibiótica	16
2.3- Variabilidad de los morfotipos e infección crónica	19
2.4- Hipermutación	20
3. Concentración antibiótica que previene la aparición de mutantes y ventana de selección	22
4. Crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> en biopelículas	25
4.1- Estructura y desarrollo de biopelículas. <i>Quorum sensing</i>	25
4.2- Sensibilidad antibiótica en biopelículas	26
5. Respuesta del sistema inmune innato	28

OBJETIVOS	33
-----------	----

## MATERIAL Y METODOS

1. Estudio epidemiológico retrospectivo	39
2. Cepas clínicas y pacientes estudiados	39
3. Cepas control	40
4. Tipificación molecular de las cepas clínicas de <i>P. aeruginosa</i> .	40
4.1- Electroforesis de campo pulsado (PFGE)	40
4.2- Multilocus sequence typing (MLST)	41
5. Estudios de sensibilidad antibiótica	44
5.1- Tiras de Etest®	45
5.2- Microdilución: determinación del valor de CMI y CMB	45
5.3- Dilución en agar	46
5.4- Sensibilidad antibiótica en biopelículas.	46

6. Determinación de la frecuencia de mutación	49
7. Concentración preventiva de aparición de mutantes (CPM)	50
8. Mecanismos de resistencia en mutantes	52
8.1 Bombas de expulsión activa	52
8.2 Estudio de porinas	53
8.3 Resistencia a quinolonas: secuenciación de la región QRDR	54
9. Ensayos de competición en filtros de nitrocelulosa	55
10. Respuesta del sistema inmune innato frente a <i>P. aeruginosa</i>	58
11. Análisis estadístico	60

## RESULTADOS

1. Colonización broncopulmonar en pacientes de la unidad de Fibrosis Quística del Hospital Universitario Ramón y Cajal	63
1.1- Características de los pacientes	63
1.2- Patrón general y evolución de la colonización broncopulmonar.	64
1.3- <i>P. aeruginosa</i> en pacientes con FQ	68
1.3.1- Distribución de morfotipos	68
1.3.2- Características de la colonización /infección por <i>P. aeruginosa</i>	70
1.3.3- Patrón de sensibilidad antibiótica de <i>P. aeruginosa</i>	71
2. Características de los aislados clínicos representativos de <i>P. aeruginosa</i>	71
2.1- Morfotipos y estructura poblacional	72
2.2- Frecuencia de mutación	81
2.3- Frecuencia de mutación en biofilm	82
2.4- Sensibilidad antibiótica	85
2.5- Sensibilidad antibiótica en biopelículas	87
2.6.- Análisis estadístico de la actividad antimicrobiana convencional y en biopelículas en cepas de <i>P. aeruginosa</i> según la frecuencia de mutación y el morfotipo	92

3. Concentración que previene la aparición de mutantes resistentes	92
4. Caracterización de los mecanismos de resistencia en mutantes obtenidos en concentraciones sub-CPM en cepas control (PAO y PAO1ΔmutS)	98
5. Dinámica de crecimiento de <i>P. aeruginosa</i>	102
5.1- Crecimiento en competición en filtros de nitrocelulosa sin antimicrobiano	105
5.2- Ensayos de crecimiento sin competición en filtros de nitrocelulosa en presencia de antimicrobianos	110
5.3- Ensayos de competición en filtros de nitrocelulosa en presencia de antimicrobiano	113
6. Respuesta del sistema inmune innato frente a <i>P. aeruginosa</i>	119
 DISCUSIÓN	 125
 CONCLUSIONES	 143
 BIBLIOGRAFIA	 147
 ANEXOS	 163

## LISTADO DE TABLAS

- Tabla 1:** Tratamiento antimicrobiano frente a *Pseudomonas aeruginosa* en el paciente con FQ (tomado de Cantón y cols., 2005).
- Tabla 2:** Factores de virulencia descritos en *P. aeruginosa* (Mandell, Bennett y Dolin 7º ed).
- Tabla 3:** Fenotipos de resistencia según el mecanismo de resistencia adquirido.
- Tabla 4:** Cebadores y condiciones utilizadas en la técnica de MLST (Curran y cols., 2004).
- Tabla 5:** Cebadores y condiciones de las bombas MDR.
- Tabla 6:** Cebadores utilizados para amplificar y secuenciar la región QRDR.
- Tabla 7:** Cebadores utilizados en los experimentos de Q-PCR.
- Tabla 8:** Características de los diferentes pulsotipos detectados.
- Tabla 9:** Distribución de los pulsotipos detectados según paciente y año.
- Tabla 10:** Valores de sensibilidad antibiótica para las 42 cepas de *P. aeruginosa* utilizando tres métodos.
- Tabla 11:** Resultados de los ensayos de sensibilidad para las cepas control.
- Tabla 12:** Actividad inhibitoria y bactericida convencionales (CMI y CMB) y en biopelículas (CMI-B y CMB-B) para las cepas controles.
- Tabla 13:** Actividad inhibitoria y bactericida convencionales (CMI y CMB) y en biopelículas (CMIB y CMBB) para las clínicas estudiadas.
- Tabla 14:** Valores de CMI y CPM para las cepas control, utilizando como inóculo crecimiento planctónico y en biofilm
- Tabla 15:** Distribución de los valores de CMI en µg/ml y de CPM para cada antibiótico utilizando inóculos plactónicos y en biopelículas.
- Tabla 16:** Valores de CMI y CPM para ciprofloxacino, tobramicina, imipenem y ceftazidima según la frecuencia de mutación de las cepas clínicas.
- Tabla 17:** Valores de CMI de diferentes antimicrobianos frente a las cepas originales y los correspondientes mutantes seleccionados.
- Tabla 18:** Mecanismos de resistencia de los diferentes mutantes con resistencia a ciprofloxacino.

**Tabla 19:** Mecanismos de resistencia de los diferentes mutantes con resistencia a tobramicina.

**Tabla 20:** Mecanismos de resistencia de los diferentes mutantes con resistencia a imipenem y ceftazidima.

## LISTADO FIGURAS

**Figura 1:** Representación del gen y la proteína CFTR.

**Figura 2:** Canales de transporte de iones que se alteran en FQ.

**Figura 3:** Clasificación de las mutaciones del gen y alteraciones en la proteína CFTR.

**Figura 4:** Proceso patogénico de la colonización /infección broncopulmonar en el paciente con FQ.

**Figura 5:** Colonización /infección bacteriana a lo largo del tiempo, según grupos de edad.

**Figura 6:** *P. aeruginosa*: Crecimiento en placa de Mueller Hinton.

**Figura 7:** Esquema del mecanismo de expulsión de antibióticos Mex-OprM.

**Figura 8:** Diferentes morfotipos de *P. aeruginosa*.

**Figura 9:** Curva farmacocinética tras la administración de un antibiótico y representación esquemática de la ventana de selección de mutantes.

**Figura 10:** Esquema representativo de la CPM.

**Figura 11:** Esquema representativo de la formación de una biopelícula.

**Figura 12:** Principales eventos que desencadenan el proceso inflamatorio exacerbado en las células epiteliales del tracto respiratorio en el paciente con FQ.

**Figura 13:** Esquema representativo seguido para determinar la concentración mínima inhibitoria en biopelícula (CMIB) en placas de microtiter.

**Figura 14:** Esquema de experimentos de CPM.

**Figura 15:** Construcción del plásmido pSMC2.

**Figura 16:** Representación esquemática del procesamiento de los filtros.

**Figura 17:** Distribución por grupos de edad de los pacientes incluidos en los periodos A y B.

**Figura 18:** Distribución de los pacientes del periodo B según su seguimiento (nuevos y antiguos).

**Figura 19:** Porcentaje de pacientes colonizados /infectados por diferentes patógenos.

**Figura 20:** Pacientes colonizados/ infectados por más de un patógeno.



**Figura 21:** Distribución de los principales microorganismos según rango de edad y periodo.

**Figura 22:** Distribución de los diferentes morfotipos de *P. aeruginosa* según los rangos etarios de los pacientes estudiados.

**Figura 23:** Distribución de la colonización por edad.

**Figura 24:** Porcentaje de cepas resistentes a los diferentes antibióticos en los dos periodos.

**Figura 25:** Dendograma de la relación genética de los pulsotipos obtenidos mediante campo pulsado de los aislados de *P. aeruginosa*.

**Figura 26:** Gel de campo pulsado utilizando la enzima de restricción *SpeI* de diferentes aislados clínicos de *P. aeruginosa*.

**Figura 27:** Distribución en el tiempo de los diferentes STs detectados en los pacientes con FQ.

**Figura 28:** Representación mediante *Minimum spanning tree* (MLST) utilizando el algoritmo goeBURST de la estructura poblacional de los principales clones descritos en FQ, de las muestras clínicas de los hospitales españoles, el clon epidémico ST235 y las cepas de nuestro estudio (P1 a P10). La línea roja representa un *single locus variant* (SLV).

**Figura 29:** Árbol filogenético de las secuencias nucleotídicas concatenadas de los siete alelos secuenciados en la técnica de MLST utilizando el software MEGA 5.0. Se han incluido otros STs descritos en FQ así como los principales ST descritos no-FQ en España.

**Figura 30:** Dendograma basado en el coeficiente de similitud de Dice.

**Figura 31:** Comparación de las secuencias nucleotídicas de los alelos *mutL*-11 y *mutL*-44 obtenidos en ST242 y ST996.

**Figura 32:** Distribución de las cepas según su frecuencia de mutación.

**Figura 33:** Distribución de las cepas según su frecuencia de mutación en condiciones de crecimiento plactónico.

**Figura 34:** Distribución de las cepas según frecuencia de mutación en condiciones de crecimiento en biopelícula.

**Figura 35:** Frecuencia de mutación en crecimiento planctónico (negro) y en biopelícula (verde) de las cepas clínicas y controles (planctónico en rojo y biopelícula en naranja).

**Figura 36:** Diferencia entre los valores de la frecuencia de mutación para crecimiento planctónico y biopelículas.

**Figura 37:** Media geométrica de los valores de CMI en  $\mu\text{g/ml}$  para cada antibiótico, según la frecuencia de mutación de las cepas y el inóculo en biopelículas o planctónico.

**Figura 38:** Media de los valores de CPM en  $\mu\text{g/ml}$  para cada antibiótico, según la frecuencia de mutación de las cepas y el inóculo en biopelículas o en planctónico.

**Figura 39:** Curva de crecimiento PAO y PAO $\Delta\text{mutS}$  por separado.

**Figura 40:** Curvas de crecimiento de las parejas isogénicas en filtros de nitrocelulosa en diferentes medios de cultivo durante seis días de incubación.

**Figura 41:** Competición de cepas normo e hipermutadoras en la misma proporción (50/50).

**Figura 42:** Competición de las cepas normo e hipermutadoras con la proporción 10/90.

**Figura 43:** Competición de cepas normo e hipermutadoras en la proporción 1/99.

**Figura 44:** Recuentos bacterianos en cultivos individuales sobre filtros de nitrocelulosa en M63 agar con ciprofloxacino.

**Figura 45:** Recuento de las cepas crecidas en filtro con diferentes concentraciones de ciprofloxacino.

**Figura 46:** Proporciones de las cepas PAO1/PAO $\Delta\text{mutS}$  en competición en presencia de antibiótico desde las 48 horas (partiendo de un inóculo 50:50).

**Figura 47:** Proporciones de las cepas JM105/JM7 $\Delta\text{mutS}$  en competición en presencia de antibiótico desde las 48 horas (partiendo de un inóculo 50:50).

**Figura 48:** PAO1/PAO $\Delta$ mutS juntas en competición desde el primer día en presencia de antibiótico.

**Figura 49:** JM7 (mutadora) y JM105 juntas en competición desde el primer día en presencia de antibiótico.

**Figura 50:** Niveles de expresión de IL-6 en monocitos/macrófagos obtenidos de voluntarios sanos tras 3 y 6 horas de exposición.

**Figura 51:** Niveles de expresión de IL-10 en monocitos /macrófagos obtenidos de voluntarios sanos tras 3 y 6 horas de exposición.

**Figura 52:** Niveles de expresión de IL-12 en monocitos /macrófagos obtenidos de voluntarios sanos tras 3 y 6 horas de expresión.

**Figura 53:** Niveles de expresión de TNF $\alpha$  en monocitos /macrófago obtenidos de voluntarios sanos tras 3 y 6 horas de exposición.

**Figura 54:** Niveles de expresión de IRAK\_M en monocitos /macrófagos obtenidos de voluntarios sanos tras 3 y 6 horas de exposición.

**Figura 55:** Niveles de expresión de TREM en monocitos /macrófagos obtenidos de voluntarios sanos tras 3 y 6 horas de exposición.



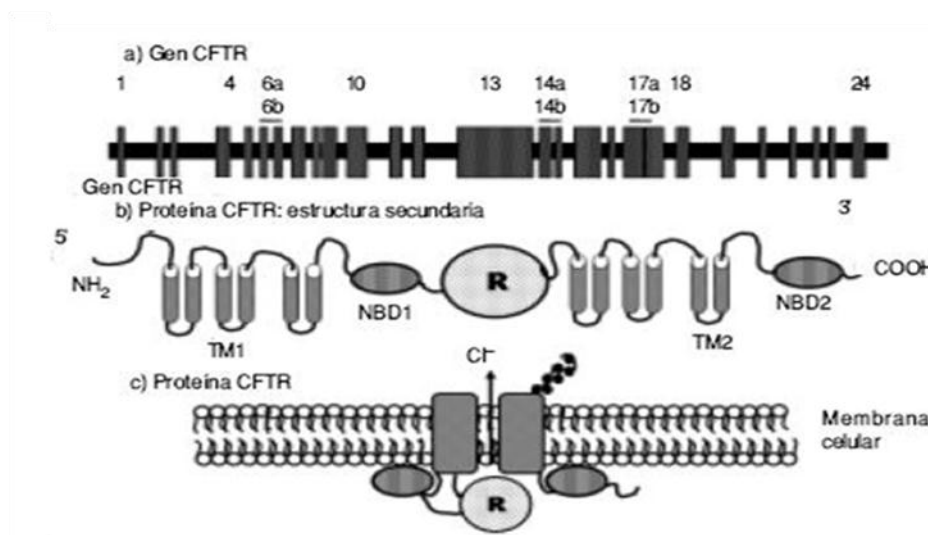
# **Introducción**



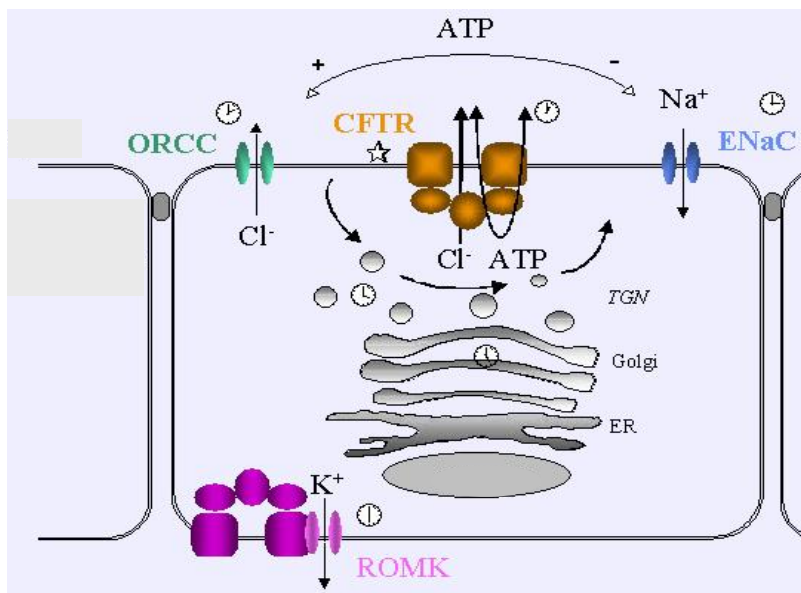
## 1. Fibrosis Quística

La fibrosis quística (FQ) es la enfermedad hereditaria autosómica recesiva más frecuente en la raza caucásica y la primera causa de enfermedad pulmonar crónica en la infancia. En la población general su frecuencia es de 1 por cada 2.500 nacidos vivos, lo que significa un portador sano por cada 25 individuos (Girón Moreno y cols., 2005).

Esta alteración genética es debida a la aparición de una mutación en el gen *regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística* (CFTR), que regula la conductancia transmembrana y se localiza en el brazo largo del cromosoma 7 (Koch y cols., 1993) (Figura 1). Este gen es el responsable de la síntesis de una proteína que actúa como canal transportador de cloro y de liberación de adenosín trifosfato (ATP). La proteína está situada en la membrana apical de las células epiteliales y exocrinas, regulando los canales de transporte de  $K^+$  y  $Na^+$  y la activación de otros canales secundarios que participan en el transporte de electrolitos (Schwiebert y cols., 1999) (Figura 2).



**Figura 1.** Representación del gen y la proteína CFTR. a) Estructura del gen CFTR: los rectángulos verticales representan los 27 exones del gen, b) Modelo propuesto de la proteína CFTR, c) Ubicación de la proteína CFTR en la membrana celular (Tomado de Riordan JR y cols., 1991).



**Figura 2.** Canales de transporte de iones que se alteran en FQ (Tomado de Schwiebert y cols., 1999).

La mutación que se detecta más frecuentemente y que además tiene mayor importancia clínica es la delección del aminoácido fenilalanina en la posición 508 ( $\Delta 508$ ). Esta mutación está presente hasta en el 70% de los individuos con FQ. Se han descrito más de 1200 mutaciones que afectan a la funcionalidad de la proteína CFTR (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html>), siendo la mayoría de ellas pequeñas delecciones con diferentes efectos, cambios en el marco de lectura, cambios de aminoácidos, terminación prematura de la proteína o alteraciones en el empalme del ARN (*splicing*).

La consecuencia directa de estas mutaciones es la alteración de la actividad de las células epiteliales exocrinas, incrementando la reabsorción de cloro y sodio. Esto desemboca en la producción de un moco mucho más denso y viscoso de lo normal que obstruye la vía aérea. El resultado final es una deshidratación de la superficie del epitelio ciliado respiratorio que impide el correcto deslizamiento del moco a través del árbol traqueobronquial (Koch y cols., 1993).

El sistema respiratorio (senos paranasales y pulmones) es el más afectado, aunque hay otros que también sufren alteraciones. En el sistema digestivo sucede algo similar a lo que acontece en el pulmón, se obstruyen los conductos del páncreas por acúmulo de secreciones, y se traduce en una disminución de la liberación de enzimas



pancreáticas. Estos procesos pueden ser tan severos que algunas de las células hormonales llegan a destruirse, originándose intolerancia a la glucosa y diabetes insulino dependiente. Otro sistema que se ve afectado con frecuencia es el sistema reproductor, especialmente en los varones, donde se obstruyen los conductos deferentes que transportan el espermatozoide de forma que puede conducir a esterilidad.

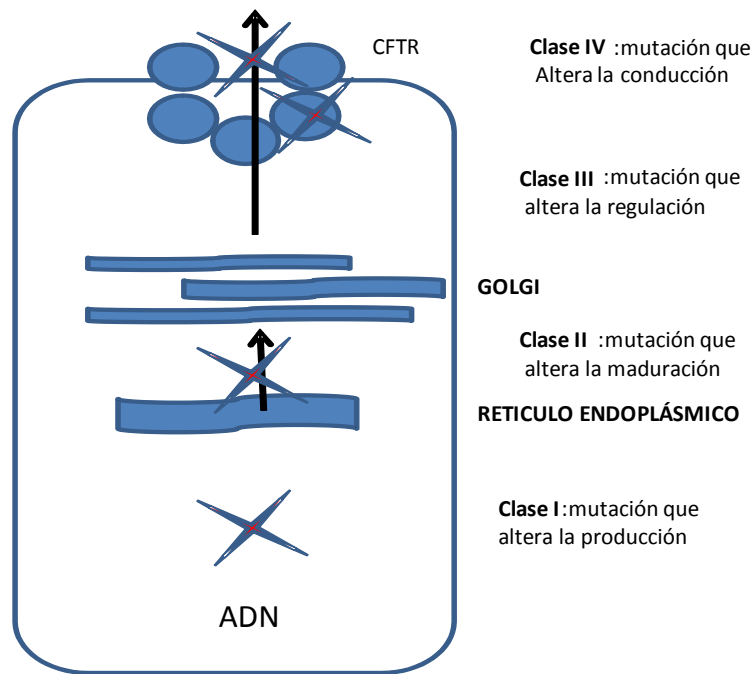
Existen diferentes grados de afectación de la enfermedad. Welsh y Smith propusieron la siguiente clasificación de estas alteraciones en relación a la función del canal del  $\text{Cl}^-$  (Figura 3) (Welsh y Smith., 1993).

Clase 1: mutaciones que provocan la síntesis de una proteína CFTR defectuosa. En esta clase se incluyen las mutaciones sin sentido y aquellas que conducen a la formación prematura de un codón de parada de la traducción. Funcionalmente todas estas mutaciones se caracterizan por una pérdida de la conductancia del canal de  $\text{Cl}^-$  en el epitelio afectado.

Clase 2: mutaciones que alteran el proceso de maduración celular de la proteína CFTR o su transporte a la membrana plasmática. El resultado final es que la proteína no está en la membrana o que está en muy baja cantidad. Las mutaciones de esta clase son las más habituales, y en ellas se incluye la mutación  $\Delta\text{F508}$ , que es la más frecuente.

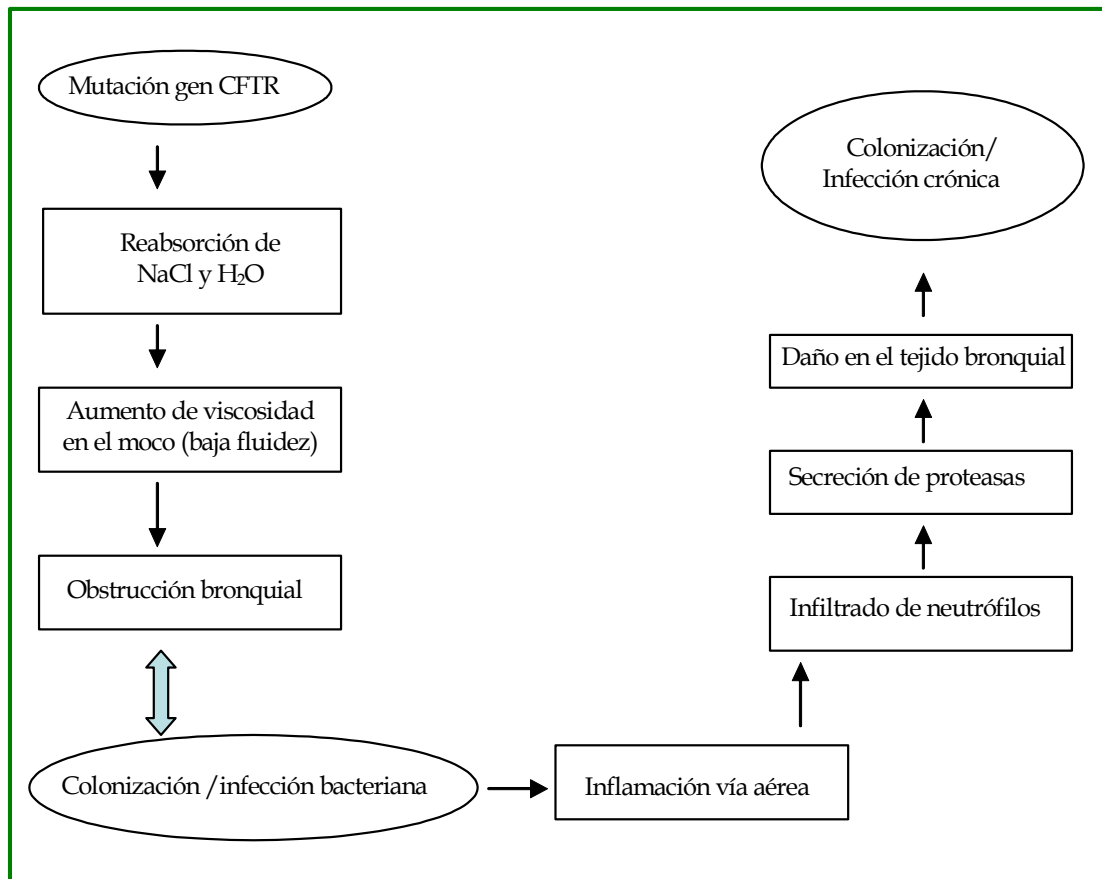
Clase 3: mutaciones que alteran la regulación del canal de  $\text{Cl}^-$ . Estas mutaciones se encuentran frecuentemente en el dominio de unión al ATP.

Clase 4: mutaciones que desorganizan la conducción del canal de  $\text{Cl}^-$ . Ciertos segmentos de los dominios que atraviesan la membrana participan en la formación de un canal de iones. Las mutaciones con cambio de sentido situadas en estas regiones generan una proteína correctamente posicionada con actividad de canal de  $\text{Cl}^-$  cAMP dependiente. Sin embargo sus características son distintas a las del canal CFTR nativo ya que muestran una disminución de la expulsión de iones y una selectividad modificada.



**Figura 3.** Clasificación de las mutaciones en el gen y proteína CFTR, según Welsh y Smith, 1993.  
(Tomado de Pascale Fanen, Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol 2001).

La enfermedad pulmonar crónica es la manifestación clínica más frecuente en los individuos con FQ, con una importante predisposición para la colonización/infección bacteriana, que a su vez mediante la secreción de diversos exoproductos y el estímulo de los mediadores de la inflamación, contribuyen a la alteración del tejido bronquial (Figura 4). Existe también una respuesta inflamatoria considerable que está causada por la propia colonización bacteriana y por la alteración del epitelio bronquial. Se manifiesta principalmente por un intenso infiltrado de neutrófilos, que a su vez mediante la secreción de proteasas dañan aún más el tejido bronquial. Asimismo el acúmulo de ADN, liberado principalmente por la lisis de los neutrófilos, incrementa la densidad y viscosidad de las secreciones respiratorias (Cantón y cols., 2005).



**Figura 4.** Proceso patológico de la colonización/infección broncopulmonar en el paciente con FQ.

### 1.1. Manifestaciones clínicas y criterios diagnósticos

Las manifestaciones clínicas de FQ son diferentes según la edad del paciente y la forma de presentación de la enfermedad:

- Enfermedad sinopulmonar crónica: colonización/infección bronquial persistente por patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* y *Pseudomonas aeruginosa*, tos y expectoración crónica, alteraciones persistentes en la radiografía de tórax y obstrucción de la vía aérea con sibilancias. Las complicaciones respiratorias son la causa más frecuente de morbi-mortalidad en los pacientes con FQ.
- Alteraciones intestinales, pancreáticas, hepáticas y nutricionales.
- Síndromes debidos a la pérdida excesiva de electrolitos por el sudor.
- Azoospermia obstructiva por ausencia congénita bilateral de conductos deferentes.

Debido a la frecuente existencia de presentaciones atípicas de la enfermedad, se ha consensuado un esquema para establecer el diagnóstico de FQ atendiendo a una serie de criterios clínicos y de laboratorio.

**A-** Presencia de uno o más de los siguientes criterios clínicos:

- Características fenotípicas: enfermedad respiratoria o digestiva compatible con FQ o ausencia bilateral de conductos deferentes.
- Historia familiar de FQ.
- Cribado neonatal positivo (elevación de tripsinemia inmunorreactiva).

**B-** Una o más pruebas de laboratorio que evidencien una disfunción en la proteína CFTR:

- Concentración elevada de cloro en el sudor ( $\geq 60$  mmol/l) en dos o más ocasiones.
- Detección de dos mutaciones reconocidas de FQ en el gen CFTR.
- Demostración de alteraciones en el transporte iónico a través del epitelio nasal (estudio de la diferencia de potencial nasal transepitelial).

Desde junio de 2009 en la Comunidad de Madrid al igual que en otras comunidades en España, se realiza un cribado neonatal en los primeros días tras el nacimiento mediante la medición de tripsinemia inmunorreactiva en una gota de sangre en el talón. La finalidad es poder diagnosticar la enfermedad antes de que aparezcan los síntomas clínicos.

### **1.2. Colonización/infección pulmonar**

Generalmente se considera el estado de colonización bacteriana como un proceso bien diferenciado al de infección. Este último se distingue del primero por la alteración de la integridad y la ausencia del mantenimiento de las barreras físicas como la piel y las mucosas. El término colonización se refiere al desarrollo de una comunidad bacteriana sin efectos lesivos para el huésped, mientras que el término de infección expresa un efecto patogénico derivado de la invasión microbiana de los tejidos (Cantón y cols., 2005).

En el contexto de la enfermedad pulmonar de FQ ambos conceptos son muy difíciles de diferenciar. La interacción de los microorganismos con el epitelio pulmonar

no debe ser considerada como un mero proceso de colonización y tampoco puede calificarse como una infección agresiva. De hecho, el paciente suele estar colonizado durante años pero sin síntomas de infección aunque con reagudizaciones esporádicas. La invasión tisular por las bacterias es excepcional, pero en muchos casos el pronóstico de vida de los pacientes depende de la erradicación bacteriana. Se trata, en suma, de una colonización con efectos patogénicos.

Los efectos patógenos que se derivan de la colonización/infección bacteriana son en primer lugar de carácter físico, ya que el acceso de oxígeno a los alvéolos pulmonares se ve comprometido. En segundo lugar los procesos de metabolismo y crecimiento bacteriano demandan un aporte significativo de sustancias como oxígeno, agua y nutrientes orgánicos e inorgánicos, que necesariamente se obtienen a expensas de reducir los que estarían disponibles para el huésped si no existiese esa colonización pulmonar. En tercer lugar los procesos de catabolismo y autólisis llevan asociada la liberación tanto de pequeñas moléculas como de macromoléculas (proteínas, oligosacáridos, fragmentos de peptidoglicano...) con potenciales efectos bioactivos sobre el huésped, incluyendo la estimulación de procesos proinflamatorios locales (Gilligan y cols., 1991; Lyczak y cols., 2002). En el paciente adulto se estima que existe una masa bacteriana de  $10^{10}$  bacterias por gramo de tejido pulmonar. Esta masa está sometida a procesos de metabolismo y replicación celular, así como de catabolismo y autólisis, sin ningún proceso de virulencia activa.

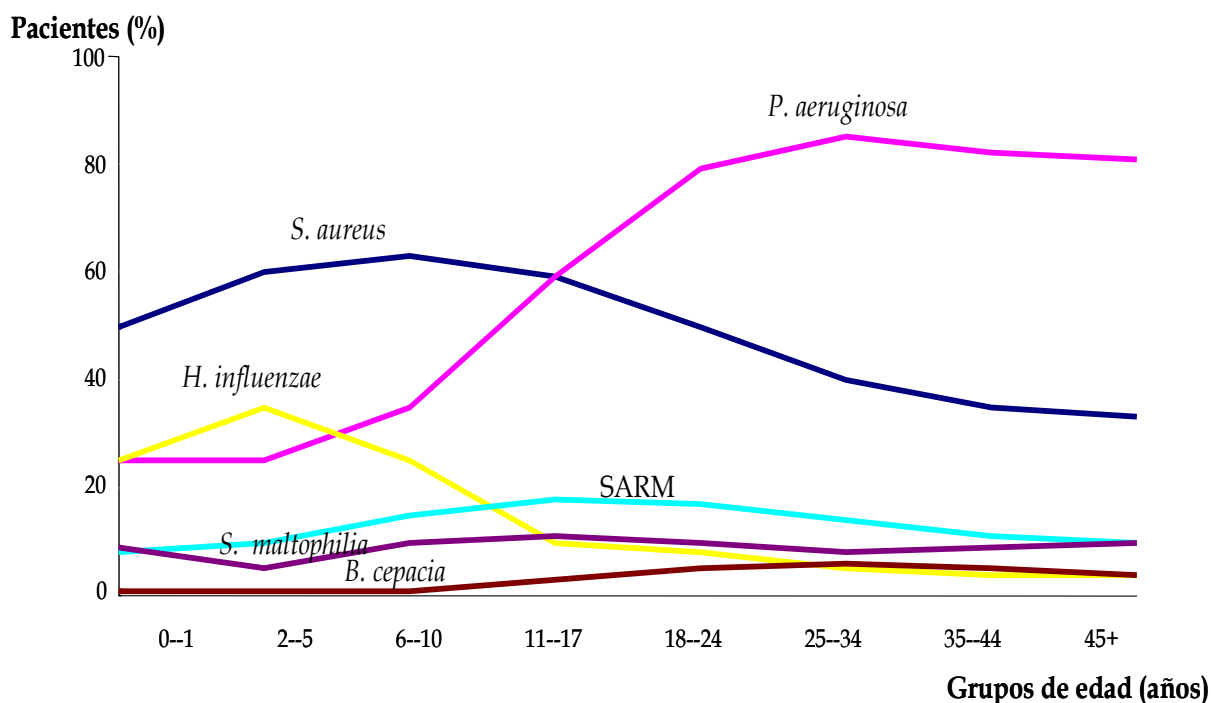
### 1.3. Progresión temporal de la colonización/infección

Los microorganismos presentes en la vía aérea presentan una secuencia temporal más o menos establecida, dependiendo de la edad del paciente. En los primeros años de vida las infecciones víricas pueden provocar la denudación del epitelio pulmonar, favoreciendo la colonización bacteriana intermitente y un estado de inflamación crónica.

Se ha demostrado que agentes víricos, principalmente *Adenovirus* y *Coronavirus* (Clifton y cols., 2008), y también determinadas bacterias, *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydophila pneumoniae* (Emre y cols., 1996), estimulan el sistema fagocítico favoreciendo la descamación del epitelio y la atracción de los neutrófilos. La consecuencia

final es una respuesta inflamatoria en el tracto respiratorio que puede evidenciarse incluso antes del aislamiento de los patógenos clásicos.

Posteriormente, la colonización más frecuente es la causada por *S. aureus* y *H. influenzae*. A menudo, *S. aureus* es el primer microorganismo que se aísla en los individuos de menor edad con FQ, y decrece su colonización con los años, aumentando gradualmente el aislamiento de *P. aeruginosa* (Figura 5). *H. influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* aparecen con menor frecuencia junto con otras especies como *Burkholderia cepacia* complex, *Achromobacter* (*Alcaligenes xylosoxydans*) o *Stenotrophomonas maltophilia* (Burns y cols., 2001). No es infrecuente encontrar en el tracto respiratorio *Aspergillus* spp, diversas especies de *Candida* y micobacterias atípicas sobre todo *Mycobacterium avium*.



**Figura 5.** Colonización/infección bacteriana a lo largo del tiempo, según grupos de edad (Datos del registro nacional de pacientes de “Cystic Fibrosis Foundation” USA, 2009).

La colonización/infección broncopulmonar continúa siendo la principal causa de morbilidad y mortalidad en los pacientes con FQ. El número de microorganismos que

colonizan crónicamente el tracto respiratorio o que están implicados en las exacerbaciones es reducido, siendo peor la evolución clínica en el caso de *S. aureus* y *P. aeruginosa*, que por otro lado son los patógenos más frecuentes (McCaffery y cols., 1999; Ratjen y cols., 2001a).

Como se ha indicado con anterioridad, la presencia de microorganismos en el epitelio bronquial activa una respuesta inflamatoria con llegada masiva de neutrófilos. La fagocitosis se altera a causa de los exoproductos liberados por los microorganismos (exopolisacáridos y enzimas proteolíticas) y por la tendencia al crecimiento en biopelículas. Esto hace que se produzcan interacciones con las interleucinas (IL), alterando la respuesta inmune del paciente y en muchos casos entrando en estado de tolerancia a endotoxinas (del Campo y cols., 2011).

## **2. *Pseudomonas aeruginosa***

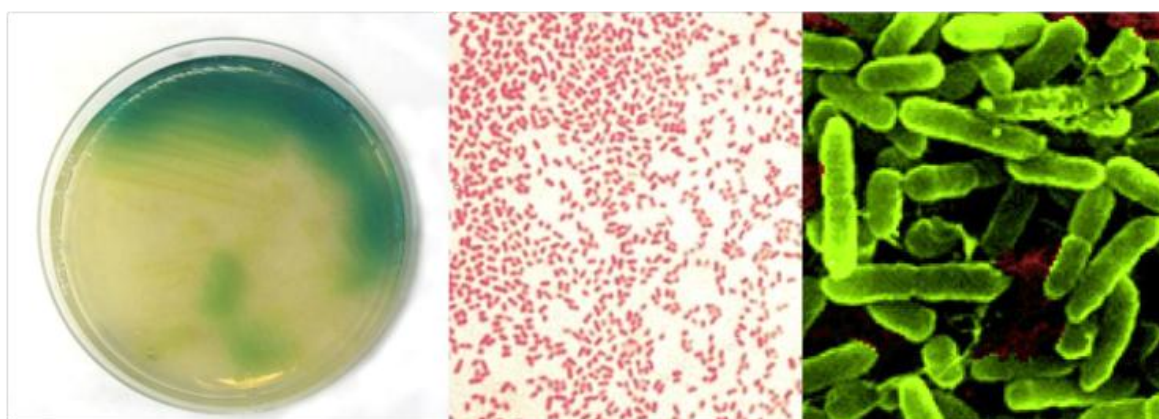
*Pseudomonas* deriva del griego *Pseudo* (falso) y *monas* (unidad), haciendo referencia a la heterogeneidad existente entre las especies que engloba este género. El nombre de la especie (*aeruginosa*) viene del color verdoso de la colonia, similar al óxido de cobre. Es un bacilo Gram-negativo aerobio, no fermentador, positivo en la prueba de la oxidasa y la catalasa y móvil, debido a la presencia de un flagelo polar. Crece en agar MacConkey formando colonias claras debido a su condición de no fermentador de lactosa.

Es un microorganismo muy ubicuo que se puede encontrar en el suelo, en la materia orgánica en descomposición, en la vegetación y en el agua. Se aísla también en el ambiente hospitalario, en los respiradores, en los equipos de diálisis, e incluso en las soluciones desinfectantes y en reservorios húmedos, como la comida, las flores, los jarrones... (Morrison y cols., 1984). La amplia distribución ambiental de esta bacteria es debida a sus escasos requerimientos nutricionales, ya que es capaz de utilizar muchos compuestos orgánicos como fuentes de carbono y de nitrógeno.

Es el patógeno con mayor incidencia y relevancia en FQ. El 60% de los pacientes están colonizados o infectados por *P. aeruginosa* en algún momento de su vida. A partir de los 10 años de edad, supera en incidencia a *S. aureus* y cuando los pacientes sobrepasan los 35 años está presente en más del 80% de los casos (Ballesteros y cols., 1993a). Existen receptores específicos para esta bacteria en las células epiteliales del árbol

respiratorio, y por ello coloniza los alveolos pulmonares, el epitelio faríngeo y los senos paranasales (de Gracia y cols., 2002).

Dentro de los numerosos morfotipos que puede presentar, el mucoso es sin duda el más característico de la infección pulmonar del paciente con FQ. Una característica esencial es su capacidad para producir alginato, un exopolisacárido formado por unidades de ácido D-manurónico parcialmente acetilado y ácido l-gulurónico cuya síntesis se produce ante situaciones de estrés y está regulada por un complejo sistema de genes (Gacesa y cols., 1990a,b). La producción de alginato es lo que le confiere el aspecto mucoso tan característico (Figura 6).



**Figura 6.** *Pseudomonas aeruginosa*: crecimiento en placa de Mueller-Hinton, tinción de Gram y visión en microscopio electrónico.

El alginato contribuye de manera importante a hacer aún más espesas las secreciones respiratorias, facilita el acantonamiento de los microorganismos y favorece su desarrollo en formación de biopelículas (agrupaciones complejas de microorganismos que se encuentran formando una comunidad adherida generalmente a una superficie sólida y embebida en una matriz de exopolisacárido).

Durante la primera mitad del siglo XX la expectativa de vida de los pacientes era muy limitada, el 70% fallecía antes de cumplir el primer año. Esta situación mejoró sustancialmente a lo largo de la segunda mitad del siglo pasado, y en la actualidad la mayoría supera ampliamente los 30 años de edad. Esto es debido, entre otros factores, a la práctica rutinaria de técnicas de fisioterapia para eliminar las secreciones respiratorias de la vía aérea, la mejora de la dieta y del tratamiento de las alteraciones pancreáticas, así como la utilización adecuada de antimicrobianos y sobre todo al perfeccionamiento de los trasplantes de pulmón.



El desarrollo de resistencias, la difícil llegada de muchos antibióticos al pulmón y la posibilidad de efectos secundarios derivados de la vía de administración (intravenosa u oral), han propiciado el desarrollo de nuevas formas de administración, como la vía inhalada, que asegura concentraciones elevadas en el lugar de la colonización/infección (Hodson y cols., 2000). En el tratamiento de *P. aeruginosa* se usó inicialmente la vía intravenosa con  $\beta$ -lactámicos con una marcada actividad antipseudomonas y también aminoglucósidos. Posteriormente, se amplió a las fluoroquinolonas, esencialmente ciprofloxacino, con posibilidad de utilización por vía oral e intravenosa y buena actividad *in vitro* (Govan y cols., 2002; Matsen y cols., 1989) (Tabla 1). La erradicación de *P. aeruginosa* una vez establecida la infección crónica es prácticamente imposible; solo durante la primocolonización se puede conseguir una erradicación eficaz. Así pues, la finalidad del tratamiento antibiótico es reducir la carga bacteriana, la respuesta inflamatoria y la producción de enzimas bacterianas que ocasionan el deterioro pulmonar (Cantón y cols., 2005). El conocimiento de la dinámica de las poblaciones (Ratjen y cols., 2001b; Saiman y cols., 2003), el riesgo de selección de resistencias por hipermutación (Oliver y cols., 2000) y los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos (PK/PD) ha provocado un cambio de estrategia de las terapias antimicrobianas (Montgomery y cols., 2001). Los nuevos esquemas proponen la asociación de diferentes familias y/o el uso de la vía inhalada. Se considera:

1. Profilaxis de colonización en edades tempranas. No se recomienda por el riesgo de aparición de resistencias (Rajan y cols., 2002; Smyth y cols., 2001).
2. Tratamiento precoz agresivo tras el primer cultivo positivo (primocolonización o colonización pionera) (Tabla 1) (Cantón y cols., 2005).
3. Tratamientos en las exacerbaciones durante la colonización crónica para disminuir al máximo los recuentos bacterianos (Rajan y cols., 2002).
4. Tratamiento de mantenimiento para prolongar el periodo entre exacerbaciones y evitar el deterioro progresivo de la función pulmonar. Sobre todo vía inhalada con aminoglucósidos, fundamentalmente tobramicina, o colistina (Cantón y cols., 2005; Doring y cols., 2000; Rajan y cols., 2002).
5. Tratamiento antimicrobiano con efecto modulador. Utilización de compuestos como la azitromicina que inhiben la formación de biopelículas y modifican las señales de *quorum sensing* (Xu y cols., 2011).

**Tabla 1 .**Tratamiento antimicrobiano frente a *P. aeruginosa* en el paciente con FQ  
(Tomado de Cantón y cols., 2005).

<b>Primer cultivo positivo por <i>P. aeruginosa</i></b>			
Situación clínica	Tratamiento de elección	Alternativa	Comentarios
Sin clínica	ciprofloxacino oral + tobramicina inhalada 3-4 semanas	Tto i.v ± Tto inhalado	Cultivo al mes de Tto :  - Negativo: mantener tto inhalado 6-12 meses.
	o  ciprofloxacino oral + colistina inhalada 3-4 semanas		- Positivo: nuevo ciclo oral e inhalado o iniciar tto iv ± inhalado, nuevo cultivo y si continúa positivo, tratar como colonización crónica.
Infección aguda	Tto iv ± Tto inhalado  12-24 días		Iniciar Tto inhalado durante o al finalizar Tto iv. En multirresistentes adecuar el Tto al perfil de sensibilidad. Tras remisión realizar cultivo y aplicar criterios anteriores.
<b>Colonización crónica por <i>P. aeruginosa</i></b>			
Situación clínica	Tratamiento de elección	Alternativa	Comentarios
Clínica estable	>6 años: tobramicina inhalada 300mg/12h con ciclos alternos ( on-off, 28 días )	Tto iv ± Tto inhalado	Cultivo al mes de Tto :  - Si es negativo mantener tto inhalado 6-12 meses mientras sea negativo.
	< 6 años : tobramicina inhalada 80 mg/12h sin ciclos alternos o colistina inhalada		- Si es positivo, nuevo ciclo oral e inhalado o iniciar tto iv ± inhalado, nuevo cultivo y si continúa positivo, tratar como colonización crónica.
Exacerbación	Ceftazidima i.v. + Tobramicina i.v. 50-70mg/Kg/24h 5-10mg/Kg/24h o cefepina i.v. o amikacina i.v 50mg/Kg/8h 20-30mg/Kg/24h 2-3 semanas 2-3 semanas		Iniciar Tto inhalado durante o al finalizar Tto iv. En multirresistentes adecuar el Tto al perfil de sensibilidad. Tras remisión clínica realizar cultivo y aplicar criterios del punto anterior.

Nota: Tto: tratamiento , i.v: intravenoso

## 2.1. Factores de virulencia

Al igual que ocurre en la mayoría de los patógenos bacterianos, en *P. aeruginosa* la virulencia es multifactorial e intervienen muchas variables que involucran tanto a la bacteria como al hospedador. En la Tabla 2 se resumen los principales factores de virulencia específicos de *P. aeruginosa* (Mandell, Bennett y Dolin 7ª ed., 2010).

**Tabla 2.** Factores de virulencia descritos en *P. aeruginosa* (Mandell, Bennett y Dolin 7ª ed., 2010).

FACTOR DE VIRULENCIA	FUNCIÓN
Flagelos	Motilidad, quimiotaxis
	Adherencia
Alginato	Formación de biopelículas
	Evasión del sistema inmunitario
Pili	Adherencia
	Reconocimiento de receptores específicos
	Adherencia
Lipopolisacárido	Efecto endotóxico
	Formación de inmunocomplejos
Exotoxina-A	Inhibición de la síntesis de proteínas
Exotoxina-S	Adherencia
	Inhibición de la síntesis de proteínas
	Interferencia con el sistema humoral –tumoral
	Formación de inmunocomplejos
Elastasas y proteasa alcalina	Actividad antiestafilocócica
	Degradación del colágeno
	Destrucción de los cilios
Leucocidina	Citotoxina
	Incremento de la permeabilidad de membrana
FosfolipasaC	Degradación de lecitina
Lipasa	Inhibición de quimiotaxis de monolitos
Ramnolípido	Estímulo de metabolismo oxidativo de monolitos

## 2.2. Resistencia antibiótica

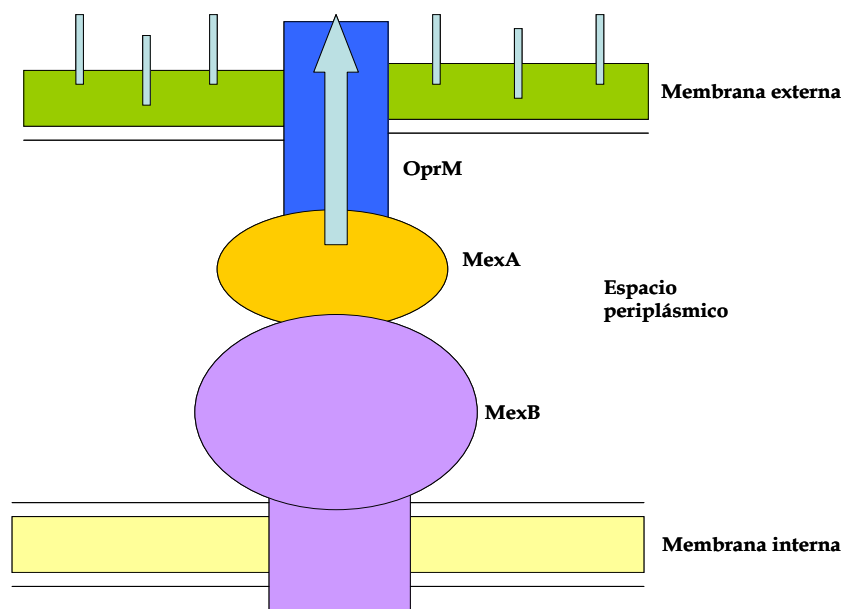
Una característica de *P. aeruginosa* es su resistencia intrínseca a los antibióticos y además, es capaz de adquirir y acumular diferentes mecanismos que confieren también una resistencia adquirida. Estos no son excluyentes y pueden producirse simultáneamente por lo que en ocasiones es difícil establecer fenotípicamente cuales son los mecanismos responsables. Los mecanismos por los que presenta resistencia intrínseca a diversos antimicrobianos son:

- Permeabilidad reducida en la membrana externa. Al igual que otros microorganismos Gram-negativos, la membrana externa dificulta el paso de los compuestos de elevado peso molecular (Nikaido y cols., 1994a). Afecta a macrólidos y a ciertos antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Por ejemplo, la ausencia o disminución de la proteína OprD confiere resistencia a imipenem, manteniéndose la sensibilidad a meropenem (Farra y cols., 2008).
- Expulsión activa. Se han identificado una serie de sistemas de expulsión activa (bombas de expulsión activa) o sistemas de multirresistencia (MDR) que son capaces de expulsar de forma relativamente inespecífica, un amplio número de sustratos no relacionados estructuralmente entre sí (Poole y cols., 2001). Además, la sobreexpresión de estos sistemas de bombeo en mutantes multirresistentes pone de manifiesto que estos mecanismos de expulsión también participan en los mecanismos de resistencia adquirida a los antimicrobianos (Poole y cols., 2000). Los sistemas MDR pertenecen a cinco familias de proteínas transportadoras, denominándose Mex los de *P. aeruginosa*, que pertenecen a la superfamilia RND (*Resistance Nodulation Cell Division*): MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY y MexJK (Figura 7), (Chuanchuen y cols., 2002; Gotoh y cols., 1995; Kohler y cols., 1997; Mine y cols., 1999; Poole y cols., 1996; Stover y cols., 2000).

MexAB-OprM y MexCD-OprJ se expresan habitualmente de forma basal. Cuando se hiperexpresan confieren resistencia a meropenem, carbenicilina, fluoroquinolonas, tetraciclinas, macrólidos y cloranfenicol. MexEF-OprN confiere resistencia a fluoroquinolonas y cloranfenicol (Kohler y cols., 1997).

El sistema MexXY es un sistema inducible, por la presencia de diferentes sustratos, que al sobreexpresarse confiere resistencia a los aminoglucósidos, las

tetraciclinas y la eritromicina (Masuda y cols., 2000). Por último, la sobreexpresión del sistema MexJK confiere resistencia al triclosán, la tetraciclina y la eritromicina.



**Figura 7.** Esquema del mecanismo de expulsión de antibióticos MexAB-OprM. La flecha indica la vía de salida del antibiótico desde el espacio periplásmico hacia el exterior de la bacteria.

- Enzimas inactivantes y modificantes. *P. aeruginosa* sintetiza intrínsecamente una  $\beta$ -lactamasa cromosómica inducible (AMPC) (Hancock y cols., 1998; Hirakata y cols., 1998) y enzimas modificantes de aminoglucósidos APH(3') y AAC(3') (Wright y cols., 1999; van Boxtel y van de Klundert., 1998).
- Baja afinidad por la diana de activación de las fluoroquinolonas. Los mecanismos de resistencia a las fluoroquinolonas incluyen mutaciones en los genes que codifican la ADN girasa (*gyrA* y *gyrB*) y la topoisomerasa IV (*parE* y *parC*) (QRDR) (Drlica, y cols., 1999). Estos mecanismos de resistencia pueden manifestarse solos o en combinación, si bien parece que *in vivo* el aumento en el grado de resistencia a las quinolonas es producto de varios mecanismos simultáneos como la sobreexpresión de sistemas de expulsión activa (Jalal y cols., 2000; Poole y cols., 2000).

La resistencia a los antibióticos en *P. aeruginosa* de pacientes con FQ se debe en su gran mayoría a la aparición de mutaciones en los genes de la bacteria, siendo mucho más raro la adquisición de material genético exógeno. La resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos suele ocurrir mediante la adquisición de  $\beta$ -lactamasas, las cuales se dividen en tres grupos: 1)  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro, entre las que destacan TEM-1, PSE-1 y PSE-4, que hidrolizan preferentemente a penicilinas y carbenicilina. 2)  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, denominadas BLEE, como pueden ser PER-1 y que confieren resistencia a penicilinas, incluyendo carbenicilina, ticarcilina y piperacilina, cefalosporinas como ceftazidima, cefepime y cefpiroma y a los monobactams aunque no a los carbapenems.

Estas  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido se inhiben por el ácido clavulánico y el tazobactam por lo que los microorganismos que las producen pueden ser sensibles a las asociaciones de ticarcilina con clavulánico y de piperacilina con tazobactam. 3) Carbapenemasas, que pueden ser de clase A, (KPCs) que se inhiben por el ácido borónico, de clase B (VIMs) que se inhiben por EDTA (Livermore y cols., 2000) y son capaces de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas y carbapenems, y las de clase D (OXAs) (Wolter y cols., 2009). Los genes de las OXAs, se encuentran como cassetes dentro de integrones y están controladas por un promotor común. Esta circunstancia propicia los fenómenos de multirresistencia.

Respecto a los aminoglucósidos, el mecanismo de resistencia adquirido más común son las enzimas modificantes de aminoglucósidos (EMAGs). Se ha descrito la existencia de dos genes que codifican 6'-N-acetiltransferasas. Estos genes se encuentran formando parte de un integrón junto a otro gen que codifica una  $\beta$ -lactamasa (Poirel y cols., 2001). Otras EMAGs que podemos encontrar en las cepas de *P. aeruginosa* se detallan en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Fenotipos de resistencia según el mecanismo de resistencia adquirido.

Mecanismo de resistencia	Fenotipo de resistencia
<b><u>β-lactamasas</u></b>	
PER-1	Penicilinas y cefalosporinas
OXA de espectro extendido	Penicilinas y cefalosporinas
IMP, VIM (carbapenemasas)	Penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas
<b><u>Enzimas modificantes de aminoglicósidos</u></b>	
AAC(6′)-II	GEN, TOB, KAN,AMK, NET, NEO
AAC(3)-II	GEN, TOB, KAN, NEO
ANT(2′′)-I	GEN, TOB, KAN
APH(3′)	KAN, NEO, PAR, (AMK)
APH(3′′) y APH(6)	STR
GEN: gentamicina, TOB: tobramicina, KAN: kanamicina, AMK: amikacina, NET: netilmicina, NEO: neomicina, STR: estreptomina.	

### 2.3. Variabilidad de los morfotipos e infección crónica

Habitualmente la colonización por *P. aeruginosa* en los pacientes con FQ se produce antes de los tres años de vida y generalmente se origina a partir de microorganismos del medioambiente (Speert y cols., 2002). Inicialmente, se detectan morfotipos no mucosos, sensibles a los antimicrobianos, y con baja densidad bacteriana (Burns y cols., 2001; Griese y cols., 2002; Rosenfeld y cols., 2001). Durante un período variable los cultivos de las muestras respiratorias pueden ser intermitentes, pero después de la primocolonización la erradicación es prácticamente imposible (Rosenfeld y cols., 2003).

Una vez se alcanza el estado de colonización crónica, el morfotipo predominante es el mucoso, mientras que en los pacientes multitratados o en períodos muy avanzados de la enfermedad aparecen los morfotipos puntiformes y metálicos (Figura 8).



Mucoso

Puntiforme

Metálico

Figura 8. Diferentes morfotipos de *P. aeruginosa* ([www.textbookofbacteriology.net](http://www.textbookofbacteriology.net)).

La gran variabilidad genética que este microorganismo posee queda demostrada por el número de morfotipos diferentes que puede presentar, y que aumenta durante el curso de la enfermedad (Ballester y cols., 1993b). Es frecuente que en la misma muestra de esputo coexistan varios morfotipos, representando la compartimentalización del nicho ecológico en el alveolo bronquial y la adaptación de *P. aeruginosa* a las diferentes condiciones medioambientales.

Estas variantes, sin embargo, tienden a aparecer dentro de un solo grupo clonal (descendientes de las bacterias pioneras o primeras colonizantes). Estudios anteriores indican un escaso grado de diversidad clonal a lo largo del curso de la enfermedad, aunque sí se pueden producir variaciones importantes en el genoma bacteriano (Burns y cols., 2001; Spencker y cols., 2000).

## 2.4. Hipermutación

Las bacterias, al igual que el resto de los seres vivos, a lo largo del tiempo se enfrentan a las necesidades contrapuestas de mantener la integridad genética y de adaptarse al medio ambiente. La mayoría de las mutaciones son producidas al azar y suelen ser neutras o desfavorables, por lo que parece lógico considerar que la evolución bacteriana tienda hacia una tasa de mutación lo más baja posible. Sin embargo, en todos los seres vivos se mantiene una cierta tasa de mutación, que quizá más que reflejar la imperfección del sistema, podría reflejar la necesidad de mantener una cierta adaptabilidad o capacidad de cambio. En situaciones desfavorables o estresantes, la necesidad de cambio aumenta



extremadamente, pues la supervivencia bacteriana está condicionada a que sean capaces de seleccionar la mutación que les permita adaptarse a este nuevo ambiente.

La frecuencia habitual en la que se encuentran eventos mutacionales en estas cepas suele ser inferior a  $1 \times 10^{-8}$ . Poblaciones con frecuencia de mutación más elevadas que las habituales se denominan poblaciones hipermutadoras ( $5 \times 10^{-6}$  y  $1 \times 10^{-7}$ ) (Oliver y cols. 2000). En estas variantes, existen defectos en los sistemas de reparación del ADN ó sistema de reparación de emparejamientos erróneos *mismatch-repair* (MMR) durante la replicación bacteriana. El proceso de intensa adaptación genética dirigido por la acumulación de múltiples mutaciones favorece la persistencia a lo largo del tiempo con alta resistencia a los antibióticos, al sistema inmune y con virulencia reducida.

En aislados de *P. aeruginosa* de FQ se ha descrito con una mayor frecuencia de lo habitual la existencia de cepas hipermutadoras (Oliver y cols., 2000), así como numerosas mutaciones en los genes del sistema MMR (Driffield y cols., 2008; Hogardt y cols., 2006; Mena y cols., 2007; Montanari y cols., 2007; Moyano y cols., 2007). La frecuencia de poblaciones mutadoras en *P. aeruginosa* de FQ solo es superada por la encontrada en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o con bronquiectasias (Maciá y cols., 2005).

El tratamiento antibiótico es un factor de estrés que favorece la selección de cepas resistentes, y por otro lado la acumulación de múltiples mutaciones favorece la persistencia de estas bacterias. Sin embargo, como consecuencia de este proceso *P. aeruginosa* sufre un coste biológico disminuyendo su *fitness* y su virulencia. Los pacientes con FQ necesitan estrategias terapéuticas que eviten el enriquecimiento de las poblaciones hipermutadoras. Entre estas estrategias caben las siguientes posibilidades:

1. Reducción de la masa bacteriana del árbol bronquial con antibióticos bactericidas a concentración suficiente para asegurar una penetración adecuada en áreas de difícil acceso.
2. Utilización de antibióticos que alcancen concentraciones que excedan los valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los posibles mutantes resistentes. Esto puede conseguirse con la utilización de aerosoles que depositan directamente el antibiótico sobre la superficie del bronquio.

3. Combinaciones de antibióticos que dificulten la selección de mutantes. Esta estrategia se basa en la escasa probabilidad que tiene una misma bacteria de presentar simultáneamente mutaciones dobles que afectan a antimicrobianos de diferentes familias.
4. Establecimiento de periodos libres de tratamiento para favorecer el desarrollo de variantes normomutadoras. Con ello se favorecería la interrupción de la presión selectiva con antimicrobianos y la posibilidad de recolonización del pulmón del paciente con variantes sensibles.

La solución teórica para evitar este problema es tan sencilla como difícil de conseguir:

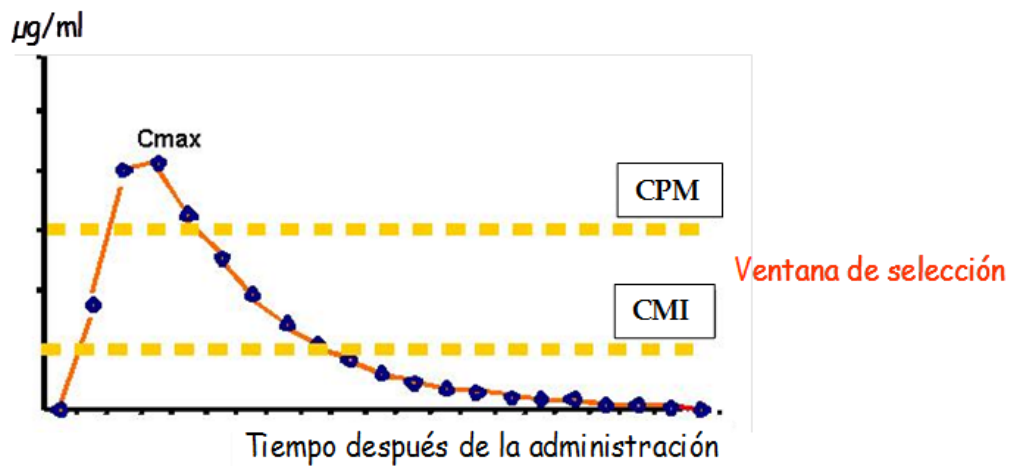
- Utilización de antibióticos frente a los cuales no exista ninguna fracción de células resistentes (o que, al menos sean lo suficientemente minoritarias para no poder desplazar a las sensibles).

- Concentraciones superiores a aquella que inhibiría el crecimiento tanto de la población sensible como de las fracciones de mutantes resistentes (concentración preventiva de mutantes, CPM), y por tanto evitaría el desarrollo de resistencia.

Se denomina ventana de selección a las concentraciones de antibióticos situadas por debajo del valor de CPM y por encima del de la CMI y que serían aquellos en los que se seleccionan los mutantes resistentes (Drlica y cols., 2006; Cantón y Morosini., 2011) (Figura 9).

### **3. Concentración antibiótica que previene la aparición de mutantes y ventana de selección**

Los conceptos de CPM y ventana de selección son consecuencia de la selección de mutantes resistentes durante el tratamiento antimicrobiano, particularmente en los procesos crónicos de infección/colonización por *P. aeruginosa* en el paciente con FQ. La ventana de selección de mutantes es la concentración de antibiótico que oscila entre la CMI de las bacterias y la CPM y hace referencia a los mutantes resistentes (Figura 9).



**Figura 9.** Curva farmacocinética tras la administración de un antibiótico y representación esquemática de la ventana de selección de mutantes.

En concentraciones de antibiótico por debajo de los valores de CMI se producen situaciones de estrés que pueden también generar la aparición de mutantes resistentes aunque no tendrían ventajas selectivas en ausencia de antimicrobianos.

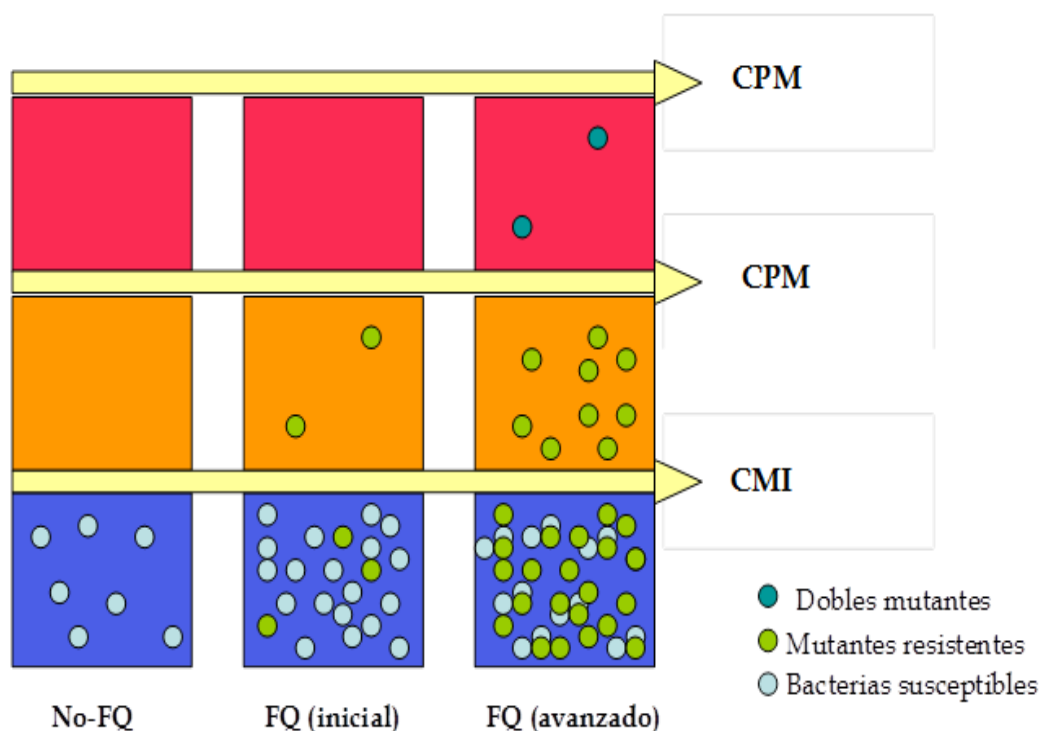
Esto contradice parcialmente los conceptos anteriores en los que se hipotetizaba que los mutantes resistentes aumentaban selectivamente con concentraciones por debajo del valor de CMI. Esta distinción es importante ya que las recomendaciones de dosis que normalmente exceden el valor de CMI y están por debajo de la CPM son más propensas a establecer las concentraciones de antimicrobianos dentro de la ventana de selección y de este modo favorecer el incremento de las subpoblaciones de mutantes resistentes. Asimismo, las bajas concentraciones de antimicrobianos no impedirían la expansión de la población de patógenos y, por consiguiente, de forma indirecta fomentan la generación de nuevos mutantes. (Baquero y Negri, 1997; Drlica y cols., 2003a; Canton y Morosini, 2011).

Por encima de la CPM, la bacteria requiere 2 o más mutaciones espontáneas que confieran resistencia para poder seguir creciendo. La presencia de 2 mutaciones concomitantes es extremadamente infrecuente. Experimentalmente, el valor de CPM se aproxima a la concentración más baja que inhibe el crecimiento de mutantes con un inóculo inicial de  $10^{10}$  colonias. La elección de este inóculo de tan alta carga bacteriana es asegurar que las subpoblaciones de mutantes estén presentes.

En la Figura 10 podemos ver la diferencia entre un individuo con FQ y un individuo sano, considerando su población de bacterias en el compartimento broncopulmonar. En primer lugar el paciente con FQ tiene una masa bacteriana mayor que la del individuo sano. El valor de concentración similar a la CMI para un antimicrobiano asegura erradicar todos los microorganismos del individuo sano, mientras que en el paciente con FQ en estadio inicial, algunas bacterias sobreviven a concentraciones de antibiótico similares al valor de CMI.

En estos casos, necesitamos aplicar concentraciones mayores de antimicrobiano llegando al nivel de CPM, asegurándonos que de esta forma se eliminan todos los microorganismos capaces de mutar y también los mutantes resistentes.

En los pacientes con FQ avanzada, dentro de la población bacteriana, con el paso del tiempo, se han ido seleccionando las cepas con mayor capacidad de mutación y llegando a existir mutantes de segundo nivel, los cuales tienen dos o más mutaciones que desarrollan resistencia al antibiótico. Para eliminar estos dobles mutantes, necesitamos aplicar concentraciones de antibiótico superiores al valor de CMI de los mismos.



**Figura 10.** Esquema representativo del concepto de Concentración que Previene la aparición de Mutantes (CPM).

#### 4. Crecimiento de *P. aeruginosa* en biopelículas

##### 4.1. Estructura y desarrollo de biopelículas (*Quorum sensing*)

El crecimiento en formación de biopelículas o biofilms es la forma de crecimiento de las bacterias en la naturaleza, aunque en el laboratorio las bacterias se cultivan habitualmente de forma planctónica. Las biopelículas son agrupaciones de microorganismos complejas que se encuentran formando una comunidad adherida generalmente a una superficie sólida y embebida en una matriz de exopolisacárido (Figura 11). Las estructuras que componen las biopelículas presentan canales para la circulación de nutrientes, así como una cierta organización funcional con distinta expresión génica en las distintas partes de éste, lo cual recuerda en cierto modo a los tejidos de los organismos superiores (Costerton y cols., 1995) (Davies y cols., 1993).

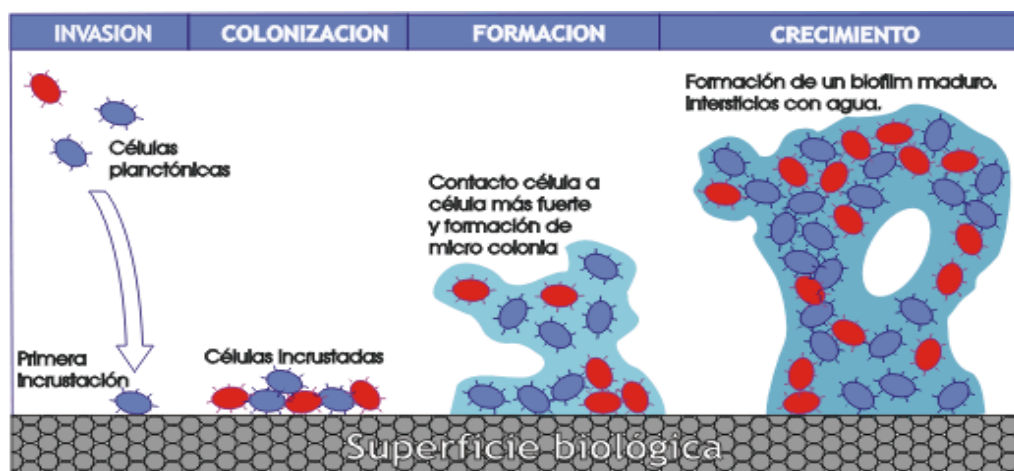


Figura 11. Esquema representativo de la formación de una biopelícula.

En el proceso de formación de la biopelícula, los microorganismos primero deben adherirse a una superficie, siendo fundamental para ello los flagelos y los pili de tipo IV. Existen mutaciones en los genes que determinan la adherencia, dando lugar a los denominados mutantes "sad" (*surface attachment defective*) que son células incapaces de crecer formando biopelículas (O'Toole y cols., 1998).

Después de producirse la adhesión a la superficie, se desencadena la activación de la transcripción de genes específicos, incluyendo *algC*, *algD* y *algU* que son necesarios para la formación de la matriz exopolisacáridica del alginato (Davies y cols., 1995). Sin

embargo para que una biopelícula se desarrolle completamente es también necesario el correcto funcionamiento del sistema denominado *quorum sensing* que incluye sensores de densidad de población.

La principal molécula implicada en el sistema *quorum sensing* de las bacterias Gram-negativas es la acil-homoserín lactona, que es producida constitutivamente por las células individuales, pero cuando la población alcanza una densidad determinada y esta molécula llega a concentraciones adecuadas, es capaz de inducir la expresión de los genes necesarios para la maduración de la biopelícula (Fuqua y cols., 1994). Este mecanismo hace que las bacterias actúen como un organismo multicelular.

En *P. aeruginosa* se han caracterizado dos sistemas de *quorum sensing*: sistema *LasR-LasI*, que controla la expresión de factores de virulencia extracelulares y sistema *RhlR-RhlI* que regula la expresión de un gran número de genes, incluyendo aquellos requeridos para la producción de diferentes metabolitos secundarios.

*RhlI* cataliza la síntesis de una butil-homoserín lactona y *LasI* dirige la síntesis de una 3-oxodecanoil-homoserin lactona. Los mutantes defectivos en *LasI* son capaces de adherirse a una superficie pero no forman biopelículas. Asimismo, añadiendo 3-oxodecanoil-homoserin lactona a los mutantes *LasI*, se restaura el desarrollo normal de la biopelícula (Davis y cols., 1998).

Por último cuando la biopelícula ya está formada, se liberan células bacterianas libres (células planctónicas) desde su parte más externa, con la finalidad de colonizar nuevas superficies y establecer nuevas poblaciones (Boyd y cols., 1994). Aún sin limitación de nutrientes, la tasa de crecimiento de las biopelículas y su metabolismo son generalmente bajos.

#### **4.2. Sensibilidad antibiótica en biopelículas**

Hay varias teorías que tratan de explicar la mayor resistencia a los antibióticos en biopelículas comparándolos con las células planctónicas. Por un lado podría existir una reducción de la concentración del antibiótico que llega a la diana por una baja difusión a través de la matriz de exopolisacárido (Bolister y cols., 1991; Gordon y cols., 1988; Ishida y cols., 1998; Nichols y cols., 1988). A su vez, esto no es un hecho generalizado, ya que se ha visto que la difusión depende del antibiótico y también se ha comprobado que los canales internos de la matriz facilitan la penetración de determinados antimicrobianos.

Una segunda hipótesis que podría explicar la baja sensibilidad a los antibióticos de los microorganismos en crecimiento en biopelículas, se basa en que algunas células del interior (sésiles) sufren limitación en el acceso a los nutrientes y por lo tanto se encuentran en estado de letargo con muy poca actividad metabólica (Brown y cols., 1999). En este sentido, se ha demostrado microscópicamente una gran heterogeneidad espacial en cuanto al estado metabólico de las distintas células que forman la biopelícula. Esta heterogeneidad constituye una importante estrategia de supervivencia ya que el poseer células en un amplio rango de estados metabólicos garantiza la supervivencia de algunas de ellas ante cualquier ataque dirigido.

Por el momento no existen sistemas que reproduzcan con total fidelidad el crecimiento y la dinámica del desarrollo de una biopelícula. Sin embargo existen una serie de dispositivos *in vitro* que lo simulan y que se han empleado en el estudio de la sensibilidad a los antibióticos en biopelículas:

- Ceri y cols., en 1999 diseñaron una nueva técnica rápida y reproducible para calcular la sensibilidad de los antibióticos en biopelícula denominada *Calgary Biofilm Device* (CBD). Consiste en añadir una suspensión bacteriana en una placa de microtitulación que se cubre con 96 púas o pinchos de poliestireno, sobre los que tras una incubación de 16 horas se adhieren las bacterias y forman una biopelícula. Al añadir un antibiótico a esta suspensión bacteriana se puede observar la inhibición de la formación de la biopelícula.
- Moskowitz y cols., en 2004 desarrollaron una técnica muy similar que también consiste en formar biopelículas en placas de microtiter cerradas con una tapa con púas. La observación de la biopelícula se produce por espectrofotometría después de haber desprendido la biopelícula por centrifugación de estas púas. También se puede observar como actúa el antibiótico frente a la biopelícula mediante lectura espectrofotométrica.
- Peht y cols., en 2009 utilizaron “alar blue” para verificar la actuación del antibiótico en la biopelícula. Una reducción química del “alar blue” supone un cambio de color y una densidad óptica diferente, y mediante algoritmos matemáticos se pueden calcular el crecimiento de las bacterias y la inhibición por parte del antibiótico.

- Simmons y cols., en 2007 comenzaron a utilizar discos de nitrocelulosa como soporte para la formación de biopelículas. Este sistema permite obtener inóculos con mayor densidad.
- Sistema de flujo continuo: constituido por un tanque de alimentación y una cámara de flujo laminar en la cual se colocan muestras de diferentes materiales para estudio, conectados entre si por una bomba peristáltica y tubos de PVC o tubos de silicona. La monitorización del crecimiento o de los efectos a diferentes tratamientos, se realiza por técnicas complementarias como la citometría de flujo o microscopia confocal.
- Benoit y cols., en 2010 utilizaron el BioFlux de alto rendimiento: sistema para la detección de la viabilidad de la biopelícula de flujo. El dispositivo consta de una bomba neumática conectada en la parte superior de una placa BioFlux. Hay pocillos de entrada y salida que contienen los medios de cultivo frescos y antiguos. Por la presión neumática de la parte superior se empuja al nuevo medio a través del canal de microfluidos (que contiene el biofilm). El biofilm se puede ver con un microscopio o escaneado con un lector de placas.

### **5. Respuesta del sistema inmune innato**

A lo largo de la vida se entra en contacto en numerosas ocasiones con microorganismos que sin embargo no ocasionan ninguna infección, y ello se debe en gran parte al sistema inmunológico. En los mamíferos, este sistema se divide en inmunidad innata e inmunidad adquirida. La inmunidad innata es la primera línea de defensa frente a agentes infecciosos y en ella participa el sistema mononuclear fagocítico, que a su vez libera citocinas inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-12p40,) y participa en la fagocitosis de las bacterias y en la posterior presentación de antígenos al sistema de inmunidad adquirida.

Por otro lado, también se han caracterizado en células del sistema inmune innato de origen mieloide una familia de receptores de membrana similares a las inmunoglobulinas que se ha denominado TREM (*Triggering Receptors Expressed on Myeloid Cell*) (Sharif y Knapp., 2008) y tiene implicación en la respuesta inflamatoria.

La expresión de estos receptores transmembrana aumenta en presencia de lipopolisacárido bacteriano, siendo capaz de actuar sinérgicamente con unos receptores



concretos que han sido denominados *Toll-Like-Receptors* (TLRs) (Rock y cols., 1998) e inducir la expresión de las citocinas. Este receptor se encuentra sobreexpresado en estados de sepsis generalizada y en patologías inflamatorias crónicas como la FQ (del Fresno y cols., 2008).

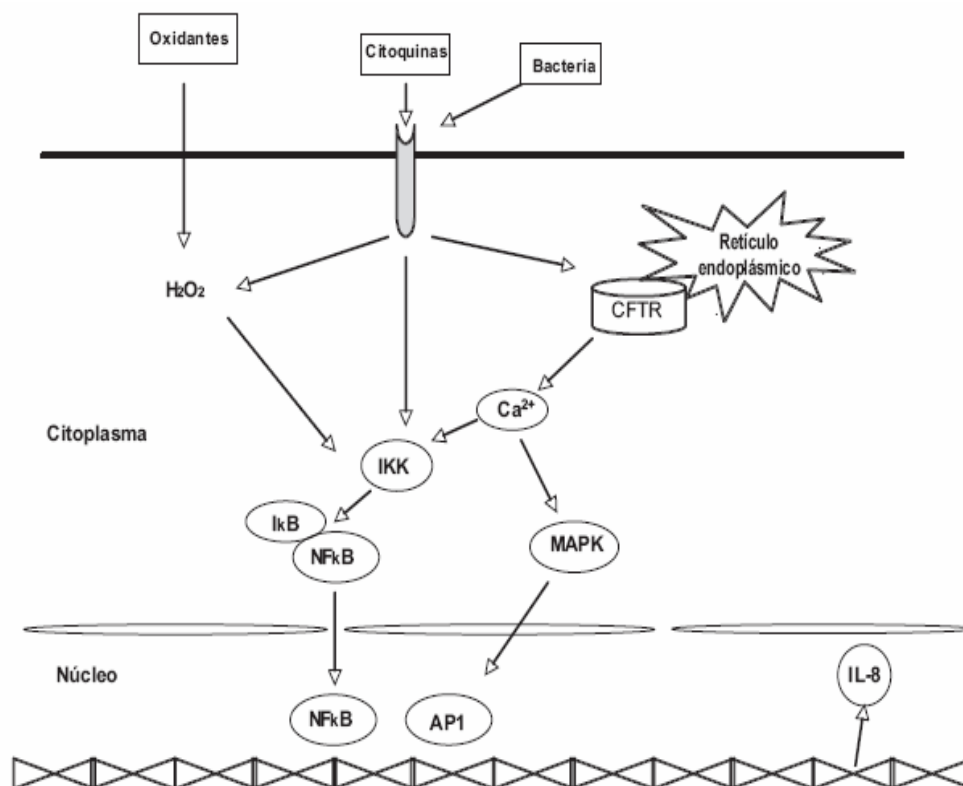
En *P. aeruginosa* se han reconocido diversos sistemas y componentes celulares que activan la cascada de mediadores de la inflamación, entre ellos los elementos de la pared como el lipopolisacárido o los componentes flagelares. Sin embargo, todos ellos no parecen ser suficientes por si mismos para explicar la hiperexpresión de los mediadores de la inflamación a nivel pulmonar que existe en FQ y sería necesaria la participación tanto de las células inflamatorias como de una alteración *per se* de los mediadores para producir este efecto (Jacquot y cols., 2008a,b). El acúmulo de ADN bacteriano liberado incrementa la densidad y viscosidad de las secreciones, dificultando su eliminación. Además, los neutrófilos, mediante la secreción de proteasas, elastasas y productos oxidativos dañan aún más el tejido bronquial.

También la secreción de estos productos estimula la producción de mucina, aumenta la viscosidad de las secreciones obstruyendo la vía aérea, altera los receptores fagocíticos en los macrófagos, aumenta la persistencia bacteriana y la persistencia de neutrófilos apoptóticos e induce una mayor secreción de mediadores que participan en el reclutamiento de los neutrófilos, como IL-8 (Jacquot y cols., 2008a,b).

En los pacientes con EPOC y FQ se ha demostrado que durante las exacerbaciones se produce un claro aumento de células que contribuyen al proceso inflamatorio: neutrófilos, eosinófilos (incluso en los pacientes con afectación leve) así como de macrófagos, linfocitos T, linfocitos B, células dendríticas y mastocitos. Estas células, al igual que las del epitelio del árbol bronquial expresan CFTR, por lo que es posible que la alteración del CFTR también sea responsable de su elevación. Asimismo, los individuos con historia frecuente de exacerbaciones suelen presentar una mayor elevación de los marcadores de la inflamación, incluidos los períodos en fase estable y mayor deterioro de la función pulmonar.

Recientemente y utilizando cultivos celulares con el modelo de la FQ se ha demostrado que como consecuencia de la alteración del CFTR del retículo endoplásmico se afecta el almacenamiento del  $\text{Ca}^{2+}$ . Un aumento de éste provocaría, mediante la actuación de intermediarios (MAPK, *mitogen activated protein kinase*, e IKK *inhibitor of k*

*light chain gene enhancer in B cell kinase*), una alteración de los niveles de Ik- $\beta$  y NF- $\kappa$ B, facilitando la síntesis de IL-8. Otra vía diferente que activaría la cascada de las citocinas proinflamatorias se produciría mediante estrés oxidativo, también debido al intenso infiltrado de neutrófilos y a los productos liberados por éstos. Se generan compuestos oxidativos (ROS, oxygen-derived reactive oxygen species), en particular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que al igual que el calcio afecta a los niveles de IKK y finalmente a la síntesis de IL-8 (Figura 12).



**Figura 12.-** Principales eventos que desencadenan el proceso inflamatorio exacerbado en las células epiteliales del tracto respiratorio en el paciente con fibrosis quística. El estímulo bacteriano (A), los diferentes mediadores de la inflamación (B) sobre receptores de superficie celular, el estrés oxidativo (C) o la alteración del Ca<sup>2+</sup> del retículo endoplásmico por modificación del CFTR endoreticular ejercen una alteración de los reguladores de la síntesis final de interleucinas, entre ellas IL-8 que estimula el reclutamiento de neutrófilos (Modificado de Jacquot y cols., 2008b).

Se ha visto que la expresión de determinados genes tiene implicación en la cascada de inflamación, proinflamación, tolerancia, etc...Estos factores son :

-IL-6 tiene una acción proinflamatoria-antiinflamatoria, se sintetiza en monocitos y macrófagos , células endoteliales y fibroblastos. Su inductor es la IL-1 y las

endotoxinas y la acción más importante es la activación de la síntesis de proteínas de fase aguda.

-IL-10 tiene acción antiinflamatoria.

-IL-12 presenta acción proinflamatoria.

-TNF $\alpha$  (Factor de Necrosis tumoral) es una citocina que actúa en la respuesta inespecífica o inflamatoria.

-TREM1 (*triggering receptor expressed on myeloid cells*) pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y actúa en la respuesta inflamatoria.

-IRAKM actúa bloqueando la cascada de señalización y por tanto la expresión de citoquinas proinflamatorias, por lo que se asocia en fenómenos de tolerancia.



## Objetivos



La colonización/infección broncopulmonar por *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística (FQ) se caracteriza por una evolución desde el inicio de la colonización, donde los aislados presentan un morfotipo no mucoso, un estado de normomutación y una alta sensibilidad a los antibióticos, hasta los estadios más crónicos en donde las cepas que se aíslan presentan morfotipo mucoso, mayores tasas de mutación y multirresistencia a los antimicrobianos.

Basándonos en esta premisa, los **objetivos generales** que nos planteamos al inicio del presente trabajo fueron:

- 1.- Describir la epidemiología de los aislados de *P. aeruginosa* obtenidos de pacientes con FQ atendidos en la Unidad de FQ del Hospital Universitario Ramón y Cajal.
- 2.- Analizar la dinámica de colonización y las ventajas ecológicas de una colección representativa de aislados de *P. aeruginosa* de pacientes con FQ en función del morfotipo, frecuencia de mutación, sensibilidad a los antimicrobianos y tipo de crecimiento.

Los **objetivos secundarios** que se abordaron fueron:

- 1.-Comparar la epidemiología de la colonización broncopulmonar por *P. aeruginosa* en los pacientes con FQ atendidos en nuestra Unidad en dos periodos separados en el tiempo (1993-1995 y 2002-2003). El último periodo es previo a la implantación de nuevas medidas de manejo de estos pacientes, administración de azitromicina oral, suero salino hipertónico inhalado o ampicilina inhalada.
- 2.-Estudiar la estructura poblacional en una colección representativa (n=42) de cepas de *P. aeruginosa* de individuos con FQ.
- 3.-Determinar la sensibilidad antibiótica y la frecuencia de mutación en la colección representativa de cepas de *P. aeruginosa*.

## OBJETIVOS

---

- 4.-Analizar las posibles diferencias y ventajas ecológicas según el tipo de crecimiento (biopelícula o planctónico), morfotipo (mucoso o no mucoso) y frecuencia de mutación (hipomutador, normomutador e hipermutador).
- 5.-Conocer la concentración que previene la aparición de mutantes (CPM) y las mutaciones en concentraciones sub-CPM que confieren resistencia a los antibióticos habitualmente utilizados en pacientes con FQ.
- 6.-Comprender la dinámica de crecimiento y de competición de *P. aeruginosa*, según su morfotipo y frecuencia de mutación, las cepas utilizadas fueron, las cepas clínicas (JM7 y JM105) y las cepas de laboratorio (PAO1 y PAO $\Delta$ mutS) las cuales son isogénicas entre sí.
- 6.-Determinar la respuesta del sistema inmune innato frente a *P. aeruginosa* (JM7 y JM105) obtenidas en pacientes con FQ con diferentes frecuencias de mutación.



## **Material y Métodos**



### **1. Estudio Epidemiológico Retrospectivo**

Se llevó a cabo un análisis retrospectivo de los datos recogidos en el Sistema Informático del Laboratorio del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal. Los resultados son producto de los cultivos de muestras respiratorias de pacientes atendidos en la Unidad de FQ de dicho hospital. Este análisis se ha dividido en dos períodos con una diferencia de 8 años con objeto de poder compararlos entre sí:

- período A: Junio 1993 - Julio 1995 (n= 81 pacientes)

- período B: Enero 2002 - Diciembre 2003 (n=127 pacientes)

Fueron recogidos todos los informes de las muestras respiratorias [esputos, broncoaspirados (BAS), lavados broncoalveolares (BAL)] correspondientes a cada paciente, buscando específicamente el primer aislado de *P. aeruginosa*, así como la co-infección/co-colonización con otros microorganismos. La finalidad de este análisis fue estudiar los posibles cambios en los patrones de colonización pulmonar.

### **2. Cepas clínicas y pacientes estudiados**

Se estudiaron 42 cepas aisladas de muestras de esputos de pacientes atendidos en la Unidad de FQ de nuestro Hospital entre los años 2002 y 2006. Las muestras respiratorias se procesaron con el protocolo habitual del laboratorio de diagnóstico microbiológico de la colonización-infección broncopulmonar. Este protocolo (método modificado de Wong y cols., 1984) comprende la homogeneización de los esputos con N-acetilcisteína, la realización de diluciones seriadas de las mismas y la siembra cuantitativa en placas de agar sangre, agar chocolate con bacitracina, agar de MacConkey, agar manitol-sal y medio selectivo diferencial para *B. cepacia* (medio OF-*B. cepacia*). Para la siembra de las diluciones se emplea un sistema de siembra semiautomático en espiral (Edi Jet, IUL., España).

Tras incubar las placas durante 24 horas a 37°C seguido de otras 24 horas a 25-30°C, se realizó el recuento del número de unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro (ml) del inóculo y se seleccionaron todas las variantes morfológicas. Las colonias morfológicamente compatibles con *Pseudomonas* spp. se seleccionaron a partir de las placas de agar MacConkey y de agar sangre, y se identificaron mediante la prueba de la oxidasa así como de otras pruebas bioquímicas habituales, empleándose

para ello los sistema semiautomáticos PASCO (Difco, Detroit, Michigan, EEUU) o WIDER (Francisco Soria Melguizo, Madrid, España).

Una vez confirmada la identificación de *P. aeruginosa*, se determinó de forma visual el morfotipo y la sensibilidad a diferentes antimicrobianos con el sistema semiautomático WIDER y el método convencional de dilución en agar siguiendo las especificaciones del CLSI (Clinical and laboratory Standards Institute). Todas las cepas se guardaron congeladas a -70° C en leche semidesnatada hasta el momento de su estudio.

### **3. Cepas control**

Para la estandarización inicial de los diferentes procedimientos se utilizaron las cepas de referencia *P. aeruginosa* PAO1 (Holloway., 1969; Stover y cols., 2000) y su derivada isogénica hipermutadora PAO1 $\Delta$ *mutS*. La cepa PAO1 $\Delta$ *mutS* presenta una delección de un fragmento *NotI-NotI* de 1,5 Kb dentro del gen *mutS* de PAO1, que ha sido reemplazado por un cassette que confiere resistencia a kanamicina (KAN) (Oliver y cols., 2004). En los estudios de sensibilidad se utilizó como control la cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853. Para los ensayos y los ensayos inmunológicos se utilizaron como controles las cepas clínicas de *P. aeruginosa* JM7 (mutadora ) y su isogénica JM105 (no mutadora) que fueron aislados de un mismo paciente.

### **4. Tipificación molecular de las cepas clínicas de *P. aeruginosa***

El análisis de clonalidad de las 42 cepas clínicas de *P. aeruginosa* se realizó mediante las técnicas de tipificación molecular de electroforesis en campo pulsado (PFGE) y *Multilocus sequence typing* (MLST) siguiendo los esquemas descritos para esta especie bacteriana.

#### **4.1. Electroforesis de campo pulsado (PFGE)**

La tipificación molecular de la relación genética de los 42 aislados se realizó utilizando la técnica de electroforesis en campo pulsado (PFGE). Esta técnica fue desarrollada en 1984 por Schwartz y Cantor, y es una variación de la electroforesis en gel de agarosa en la cual la orientación del campo eléctrico no es unidireccional sino alternante. Este cambio periódico en la dirección de migración de las moléculas de ADN, previamente digerido con endonucleasas de baja frecuencia de corte, permite separar fragmentos de ADN de alto peso molecular, produciéndose patrones de 5 a 20 fragmentos de un tamaño de 10 a 800 Kb.

Para la realización de esta técnica se llevaron a cabo los siguientes pasos:

1) Se inoculó una colonia de cada aislado en 1 ml de caldo Luria Broth (LB) (Oxoid, LTD., Basingstoke, Hampshire, R.U) y se incubó durante 16 horas a 37°C.

2) El cultivo obtenido se centrifugó a 4.000 rpm durante 10 minutos y el sedimento se resuspendió en 100 µl de solución estabilizadora SE (75 mM ClNa, 25 mM EDTA pH7,4).

3) Los 100 µl de esta suspensión se mezclaron con 100 µl de agarosa al 2% (Pulsed Field Certificated, BioRad), dicha mezcla se depositó en moldes adecuados y se enfrió a 4°C durante 10 minutos.

4) Los bloques de agarosa formados se depositaron en tubos con 1 ml de solución de lisis (50 mM Tris-ClH pH8, 50 mM EDTA pH 9,5, 1% sarcosyl y proteinasa K 1 mg/ml) y se incubaron durante 16 horas a 56°C con agitación. Posteriormente, la solución de lisis se decantó y se sustituyó por 1 ml de solución TE (10 mM Tris ClH pH 8, 0,1 mM EDTA) incubándose nuevamente durante 15 minutos a 56°C.

5) Los bloques de agarosa se lavaron 2 veces más con 1 ml de TE durante 15 minutos a 35°C y después del último lavado se mantuvieron a 4°C en esta solución hasta su uso.

6) La digestión de los bloques se realizó con la enzima *SpeI* (10–20 U para cada bloque) durante al menos 3 horas.

7) Los bloques se lavaron nuevamente con TE y se cargaron en un gel de agarosa al 1,2%.

8) Las condiciones que se aplicaron a la electroforesis fueron: 5-40 seg durante 22 horas a 6 v/cm<sup>2</sup> y 14°C.

#### **4.2. Multilocus sequence typing (MLST)**

Esta técnica consiste en amplificar y comparar las secuencias de siete genes altamente conservados y que son imprescindibles para el mantenimiento celular (*housekeeping genes*), asignando un número a cada alelo. Las distintas combinaciones de alelos se asignaron con su correspondiente secuencia tipo (ST) según las bases de datos correspondiente a *P. aeruginosa* recogidas en la página web desarrollada por Keith Jolley en la Universidad de Oxford: <http://pubmlst.org/paeruginosa/>.

Los genes utilizados en este esquema de MLST fueron: (Curran y cols., 2004), *acsA* (Acetyl coenzyme A synthetase), *aroE* (Shikimate dehydrogenase), *guaA* (GMP synthase), *mutL* (DNA mismatch repair protein), *nuoD* (NADH dehydrogenase I chain C, D), *ppsA* (Phosphoenolpyruvate synthase) y *trpE* (Anthralite synthetase component I) (Tabla 4).

**Tabla 4.** Cebadores y condiciones utilizadas en la técnica de MLST (Curran y cols., 2004).

Gen	CEBADORES	SECUENCIA (5'-3')	CONDICIONES
<i>acsA</i> (390pb)	<i>acsA-F</i>	AAGGGCGTGCTGCATACCA	1 ciclo de 10 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 60°C, 1 min a 72; extensión final de 10 min a 72°C
	<i>acsA-R</i>	CGGCCAGGAAGTCGAGGATC	
<i>aroE</i> (498 pb) amplificación	<i>aroE-F</i>	TGGGGCTATGACTGGAAAC	1 ciclo de 10 min a 95°C; 40 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 57°C, 1 min a 72; extensión final de 10 min a 72°C
	<i>aroE-R</i>	TAACCCGGTTTTGTGATTCCTA	
<i>aroE</i> (498 pb) secuenciación	<i>aroE-F</i>	ATGTCACCGTGCCGTTCAAG	
	<i>aroE-R</i>	TGAAGGCAGTCGGTTCCTTG	
<i>guaA</i> (373 pb)	<i>guaA-F</i>	ACTACGGCGTGCAATTCCAC	1 ciclo de 10 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 60°C, 1 min a 72; extensión final de 10 min a 72°C
	<i>guaA-R</i>	GAACGGGTGGCGGTAGACC	
<i>mutL</i> (442 pb) amplificación	<i>mutL-F</i>	CCAGATCGCCGCCGGTGAGGT	1 ciclo de 10 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 57°C, 1 min a 72; extensión final de 10 min a 72°C
	<i>mutL-R</i>	CAGGGTGCCATAGAGGAAGTC	
<i>mutL</i> (442 pb) secuenciación	<i>mutL-F</i>	AGAAGACCGAGTTCGACCAT	
	<i>mutL-R</i>	GGTGCCATAGAGGAAGTCAT	
<i>nuoD</i> (366 pb)	<i>nuoD-F</i>	GGGACATGTACGGCATCACCT	1 ciclo de 10 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 60°C, 1 min a 72; extensión final de 10 min a 72°C
	<i>nuoD-R</i>	GCGCAGGATGCTGTTCTTCA	
<i>ppsA</i> (370 pb)	<i>ppsA-F</i>	CGGTCAAGGTAGTGGACGTCG	1 ciclo de 10 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 60°C, 1 min a 72; extensión final de 10 min a 72°C
	<i>ppsA-R</i>	TTCTTGCGCACATCGAAACC	
<i>trpE</i> (443pb)	<i>trpE-F</i>	CGCGAGGACTATGAAAACGC	1 ciclo de 10 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 55°C, 1 min a 72; extensión final de 10 min a 72°C
	<i>trpE-R</i>	CGCTTGTTGATGGTTTCTT	

La amplificación de los distintos genes se realizó a partir de ADN genómico extraído mediante el kit comercial QiAmp (Qiagen GmbH, Hilden Alemania). Los cebadores utilizados así como las condiciones de amplificación se encuentran recogidas en la Tabla 4.

Los productos de amplificación se separaron por electroforesis convencional en un gel de agarosa al 1% disuelta en tampón TBE (0,5 X) (Tris Borato, EDTA) y se visualizaron por tinción en bromuro de etidio a una concentración final de 0,2 µg/ml. El bromuro de etidio es un agente que se intercala en el ADN y que permite visualizar las moléculas de ácido nucleico mediante luz ultravioleta.

Los productos de PCR obtenidos se purifican con ExoSAP-it® purification kit (USB CORP., Cleveland, OH, EEUU) y fueron secuenciados por (<http://www.macrogen.com>) utilizando un secuenciador automático 373XL DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

El análisis de las secuencias nucleotídicas se realizó mediante el programa Chromas Lite (versión 2.1, Technalysian pty. Ltd, Tewantin, Australia).

Las secuencias se alinearon con el alelo número 1 de cada uno de los genes mediante la aplicación ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk>) y la asignación del alelo correspondiente se realizó a través de la página web <http://pubmlst.org/paeruginosa>.

La comparación y determinación de los complejos clonales se realizó mediante el algoritmo goEburst (<http://goeburst.phyloviz.net>). Se construyó un árbol filogenético con las secuencias concatenadas utilizando el software MEGA 5.0.

### **5. Estudios de sensibilidad antibiótica**

Las pruebas de sensibilidad o antibiograma definen la actividad *in vitro* de un antibiótico frente a un microorganismo determinado e indican la concentración necesaria para inhibir el crecimiento de una población bacteriana. La determinación de sensibilidad a diferentes agentes antimicrobianos de la colección de microorganismos estudiada se realizó diferentes métodos: Etest®, métodos de dilución (microdilución en caldo) y dilución en agar, Así mismo se utilizaron dos tipos de inóculos: planctónico y biopelículas.



### 5.1 Etest®

Se trata de una técnica para la determinación cuantitativa del valor de CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) que utiliza una tira de plástico impregnada de antibiótico con un rango de concentración creciente y variable según el agente antimicrobiano. La tira se deposita en una placa de agar inoculada con una suspensión bacteriana 0,5 en una escala McFarland en suero fisiológico.

El valor de CMI corresponde al valor que aparece en el punto de intersección del halo de inhibición de crecimiento bacteriano de forma elipsoidal. Este procedimiento se realizó siguiendo las recomendaciones de la casa comercial (AB BIODISK, Solma, Suecia).

En este trabajo se utilizaron tiras de Etest® de ciprofloxacino, tobramicina, imipenem y ceftazidima. Las placas fueron incubadas durante 18-24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  y se procedió a la lectura según las recomendaciones del fabricante.

### 5.2 Microdilución: determinación del valor de CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) y CMB (Concentración Mínima Bactericida)

La microdilución en caldo es uno de los métodos de referencia para la determinación cuantitativa de la CMI a un determinado antibiótico y consiste en una determinación visual del crecimiento en presencia de concentraciones crecientes de antibiótico.

El inóculo se preparó a partir de suspensiones 0,5 en la escala de McFarland (equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml) que fue diluido 1:1000 en caldo Muller Hinton. Para alcanzar una concentración final de  $10^4$ - $10^5$  UFC/ml se emplearon placas de 96 pocillos (Alpha Laboratorios Ltd, Hampshire, UK) con un volumen final de 100  $\mu\text{l}$  en cada pocillo. Estas placas fueron incubadas durante 18-20 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  y el valor de CMI se definió como la menor concentración de antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento del microorganismo estudiado.

También se estudió la concentración mínima bactericida (CMB) del antibiótico, sembrando 10  $\mu\text{l}$  del primer pocillo donde no hay crecimiento visible y de los pocillos siguientes en placas de MH agar. Tras incubar durante 24 horas estos subcultivos, se definió como CMB la primera concentración en la que ya no se observó crecimiento de colonias viables en las placas.

Los antibióticos y rango de concentraciones empleados fueron ceftazidima (2-1024  $\mu\text{g/ml}$ ); imipenem (0,5-256  $\mu\text{g/ml}$ ); tobramicina (0,5-256  $\mu\text{g/ml}$ ); ciprofloxacino (0,25-128  $\mu\text{g/ml}$ ) y levofloxacino (0,25-128  $\mu\text{g/ml}$ ). Todos los compuestos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Munich, Alemania), excepto levofloxacino, que fue suministrado directamente por la empresa Sanofi-Aventis (Barcelona, España).

Los antibióticos se disolvieron siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para todos los antimicrobianos se consideraron los puntos de corte recomendados por el manual CLSI (M100-S10, 2010).

### 5.3. Dilución en agar

Para el método de dilución en agar se empleó MH agar (Oxoid) con diluciones seriadas de los diferentes antibióticos siguiendo las recomendaciones de CLSI (M100-S10, 2010). Estas placas se inocularon mediante un replicador de Steers a una concentración final de  $10^4$  UFC/depósito. Estas placas fueron incubadas durante 18-20 horas a  $37^\circ\text{C}$  y el valor de CMI fue definido como la concentración más baja de antimicrobiano en la que no se observó crecimiento.

### 5.4. Sensibilidad antibiótica en biopelícula

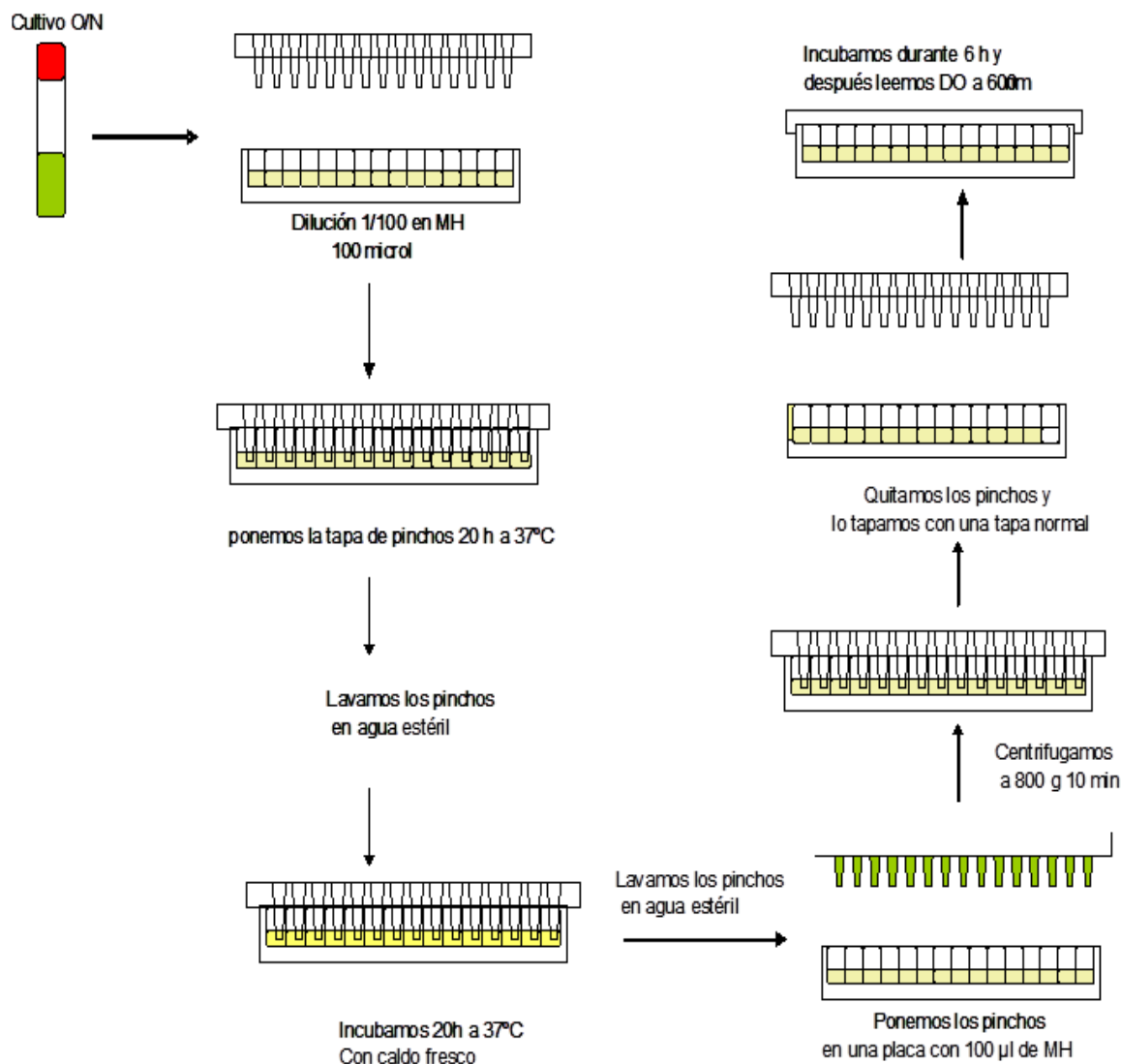
Se determinó la concentración inhibitoria de diferentes antimicrobianos frente a las bacterias pero utilizando como inóculo un crecimiento en biopelícula (CMI-Biopelícula). Para ello, se utilizó un método desarrollado por Moskowitz (Moskowitz y cols., 2004).

En primer lugar se inoculó una colonia aislada en 10 ml de caldo LB, y se incubó con agitación durante 16 horas a  $37^\circ\text{C}$ . Este cultivo se diluyó en caldo fresco de Mueller-Hinton (MH) hasta alcanzar una concentración de  $10^6$  UFC/ml, y se añadieron 100  $\mu\text{l}$  a placas de microtitulación o microtiter de 96 pocillos de fondo plano (Nunc-TSP, System, Nunc, Roskilde, Dinamarca). Estas placas se cubrieron con una tapa que contiene 96 pinchos de poliestireno alrededor de los cuales se desarrolla la biopelícula (Nunc-TS, System, Nunc, Roskilde, Dinamarca), y se incubaron durante 18 h a  $37^\circ\text{C}$  (Figura 13).

Los pinchos se lavaron con agua estéril tres veces y se colocaron de nuevo en otra placa de microtiter con las diluciones seriadas de los antibióticos a evaluar. El inóculo final que queda adherido en los pinchos fue de  $4 \times 10^7$  -  $2 \times 10^8$  UFC/ml.

Las placas se incubaron durante 18 horas a 37°C y se lavaron de nuevo los pinchos tres veces, colocándolos después en otra placa con 100 µl de caldo fresco de MH en cada pocillo. Todo el dispositivo se centrifugó durante 10 min a 800 g para depositar el biopelícula adherida al pincho en el pocillo.

Tras la centrifugación (tiempo cero) se midió por espectrofotometría (Flow Titertek Multiskan Plus, Flor Laboratorios, Finlandia) la densidad óptica (DO) del cultivo a una longitud de onda de 595 nm. Después se incubó durante 6 horas a 37°C y se midió de nuevo la DO. Se determinaron las diferencias de los valores de DO a tiempo 0 y tras las 6 horas de incubación, definiéndose como CMIB (concentración mínima inhibitoria en biopelícula) la primera concentración de antibiótico en la cual no se observó crecimiento (Figura 13).



**Figura 13.** Esquema representativo seguido para determinar la concentración mínima inhibitoria en biopelícula (CMIB) en placas de microtiter.

Como control negativo de esterilidad se utilizaron pocillos a los que sólo se añadió medio de cultivo y como control positivo de crecimiento en ausencia de antibiótico se utilizaron pocillos con medio de cultivo sin antibiótico. El experimento se reveló tras incubar 6 horas la placa de microtiter, se midió la densidad óptica que nos indicó el crecimiento en biopelícula y los valores de CMI-Biopelícula (CMI-B).

Posteriormente, evaluamos la Concentración Mínima Bactericida en Biopelícula (CMB-Biopelícula, CMB-B). Para ello, 10 µl del primer pocillo en el cual no ha habido crecimiento visible, ni detectado espectrofotométricamente, se inocularon en placas de

MH. Se sembraron todas las diluciones por encima del valor de CMI-B, para comprobar la actividad bactericida del antibiótico frente a la biopelícula.

Los antibióticos empleados en los experimentos de sensibilidad en biopelícula así como los rangos de concentraciones fueron los siguientes: ceftazidima: 2-1024 µg/ml; imipenem: 0,5-256 µg/ml; tobramicina: 0,5-256 µg /ml; ciprofloxacino: 0,25-128 µg/ml; levofloxacino: 0,25-128 µg/ml; tetraciclina: 4-2048 µg/ml; colistina: 0,5-256 µg/ml y azitromicina: 0,5-256 µg/ml.

## **6. Determinación de la frecuencia de mutación**

El cálculo de la frecuencia de mutación para rifampicina se realizó en las 42 cepas del estudio que inicialmente eran sensibles a este antibiótico. La determinación para cada cepa se realizó por triplicado, y el resultado expresa la media de los tres valores obtenidos. Se siguió el protocolo que se detalla a continuación:

- 1) Se suspendió una colonia aislada en 10 ml de MH caldo y se incubó con agitación fuerte durante 16 horas a 37°C.
- 2) Para calcular el total de células viables se sembraron alícuotas de 100 µl de diluciones seriadas de dicha suspensión en placas de LB agar. El recuento de dichas colonias se realizó a las 24 horas.
- 3) Para el cálculo de células mutadoras se sembraron 500 µl del cultivo inicial en placas de LB agar con 300 µg/ml de rifampicina realizándose el recuento de éstas a las 48 horas. La frecuencia de mutación se definió como la proporción de colonias mutantes respecto al total de células viables.

También se calculó la frecuencia de mutación de las mismas cepas pero utilizando como inóculo un crecimiento en biopelícula. En primer lugar se procedió a crecer cada una de las cepas en biopelícula. Para ello, se resuspendió una colonia aislada en 10 ml de caldo LB, y se incubó durante 16 horas a 37°C con agitación fuerte (Blondeau y cols., 2001). Se subcultivó una alícuota de 200 µl de este cultivo en 10 ml de caldo LB fresco, con las mismas condiciones anteriores hasta alcanzar una densidad de cultivo correspondiente entre  $10^9$ - $10^{10}$  UFC/ml. De este cultivo, se inocularon 100 µl en filtros de nitrocelulosa depositados sobre placas de LB, que se incubaron durante tres

días a 37°C. Pasado este tiempo, se recogieron todas las células incluidas en la matriz de esta biopelícula, resuspendiéndolas en 3 ml de solución salina.

Para calcular el total de células mutadoras, se plaquearon 500 µl de esta suspensión en placas de LB agar suplementado con 300 µg/ml de rifampicina. Por otro lado para calcular el total de células viables de las que partimos, se sembraron alícuotas de 100 µl de diluciones seriadas de dicha suspensión en placas de LB agar. El recuento de colonias viables se realizó a las 24 horas y el de las células mutantes a las 48 horas en las placas de LB con rifampicina.

La frecuencia de mutación se definió como la proporción de colonias mutantes respecto al total de células viables. Los criterios de clasificación fueron hipomutadoras ( $5 \times 10^{-10}$ - $5 \times 10^{-9}$ ), normomutadoras ( $7.5 \times 10^{-9}$ - $7.5 \times 10^{-8}$ ) e hipermutadoras ( $1 \times 10^{-7}$ - $5 \times 10^{-6}$ ).

### **7. Concentración preventiva de aparición de mutantes (CPM)**

Los antibióticos empleados para determinar el valor de CPM en las 42 cepas estudiadas fueron ceftazidima, imipenem, tobramicina y ciprofloxacino. El protocolo seguido está basado en uno descrito anteriormente por (Blondeau y cols., 2001).

1) Se resuspendió una colonia en 10 ml de caldo LB, incubándose durante 16 horas a 37°C con agitación. Una alícuota de 200 µl de este cultivo se subcultivó en 10 ml de caldo LB fresco hasta alcanzar  $10^9$ - $10^{10}$  UFC/ml, inoculando después con 500 µl placas de LB con diluciones seriadas de los antibióticos, e incubándolas a 37°C durante 48 horas.

Cuando aparecieron colonias aisladas en las placas con concentraciones de antibiótico por debajo del valor de CPM, correspondiente a las placas con menor concentración en la que no hubo crecimiento, se sembraron nuevamente en placas de LB agar con la misma concentración de antibiótico para comprobar que realmente eran verdaderos mutantes resistentes (Figura 14).

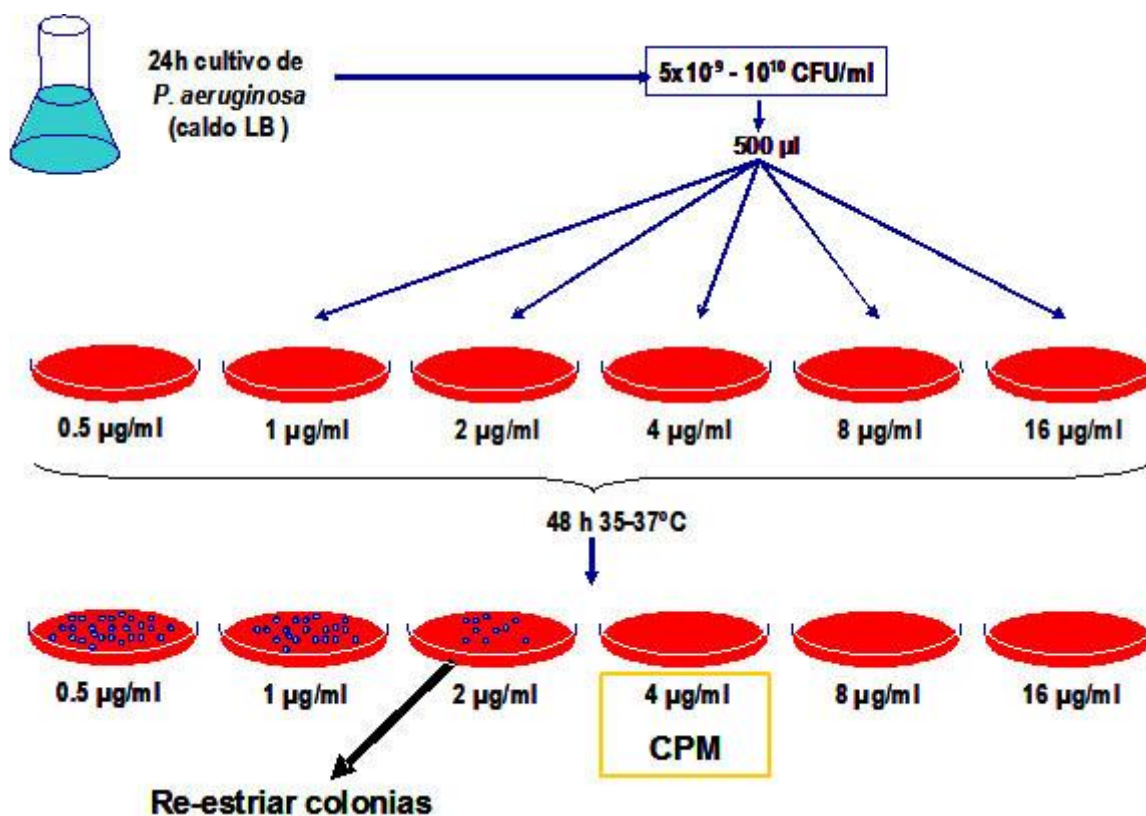


Figura 14. Esquema de experimentos de CPM.

El valor de CPM de todas las cepas se calculó nuevamente, pero en esta ocasión utilizando un inóculo en crecimiento en biopelícula para poder compararlo con los valores obtenidos en crecimiento planctónico. Los antibióticos empleados para determinar el valor de CPM en biopelícula fueron los mismos que para la CPM convencional, es decir ciprofloxacino, ceftazidima, imipenem y tobramicina.

El protocolo seguido fue una modificación del anterior:

- 1) Se resuspendió una colonia aislada en 10 ml de caldo LB, incubándose durante 16 h a 37°C con agitación. Una alícuota de 200 µl de este cultivo fue subcultivada en 10 ml de caldo LB fresco en las mismas condiciones descritas anteriormente hasta alcanzar una concentración  $10^9$ - $10^{10}$  UFC/ml. Posteriormente se sembraron 100 µl en filtros de nitrocelulosa depositados en placas de LB durante tres días a 37°C para conseguir la formación de un biopelícula.

A continuación se recogieron los filtros y se resuspendieron en 3 ml de solución salina, plaqueando 500 µl de esta suspensión en placas de LB agar que contenían diluciones seriadas de los antimicrobianos anteriormente citados. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 48 h y el valor de CPM fue definido como la concentración más baja de antimicrobiano en la que no hubo crecimiento visible.

- 2) Las colonias aisladas en las placas con concentraciones de antibiótico por debajo del valor de CPM (correspondiente a las placas con menor concentración en la que hubo crecimiento), se sembraron nuevamente en placas de LB agar con la misma concentración de antibiótico para comprobar que realmente eran verdaderos mutantes y no una consecuencia del crecimiento por el efecto del alto inóculo.

### **8. Mecanismos de resistencia en mutantes**

A partir de un inóculo de las cepas control PAO1 y PAO1 $\Delta$ mutS, ambas sensibles a los antibióticos, se seleccionaron mediante la técnica de CPM colonias mutantes para ciprofloxacino (n=17), tobramicina (n=2), imipenem (n=6) y ceftazidima (n=11). En estos mutantes se determinó el mecanismo por el cual habían adquirido resistencia a cada uno de estos antibióticos.

#### **8.1. Bombas de expulsión activa**

En primer lugar, se analizó como se había modificado la expresión de las bombas MDR en los mutantes. Para ello, se extrajo el ARNm de un cultivo de 15 ml en caldo LB, que se dejó crecer a 37°C hasta llegar a una DO de 0,6 nm. El cultivo se centrifugó 10 minutos a 6.000 rpm, se recogió el pellet y se congeló en nitrógeno líquido. El ARNm se extrajo según el protocolo de QIAGEN (RNeasy Protect Mini Kit) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Seguidamente se emplearon 2 µl del ARN extraído para llevar a cabo la técnica de RT-PCR utilizando para ello el equipo de Amersham Biociences (Ready To-Go RT-PCR Beads). Los cebadores utilizados se muestran en la tabla 5.



**Tabla 5.** Cebadores y condiciones de las bombas MDR.

Cebadores	Secuencia (5'→3')	Tamaño	T <sup>a</sup> anillamiento
<i>mex-A</i>	CCTGCTGGTCGCGATTTCGG	330	62°C
	CCAGCAGCTTGTAGCGCTGG		62°C
<i>mex-C</i>	TTGGCTATGGCCATCGCGTT	400	55°C
	ATCGAAGTCCTGCTGGCTGA		55°C
<i>mex-X</i>	GCGATGCGGATTGCGGAACA	190	60°C
	TGGTCGCCCTATTCCTGCTG		60°C

Los resultados se visualizaron mediante electroforesis convencional en geles de agarosa D-1 LOW EEO (Pronadisa, España) al 2% en TAE 0,5x durante 20 minutos a 100 voltios. Los geles se tiñeron en una solución de 1 µg/ml de bromuro de etidio en agua y se visualizó el producto amplificado en un transiluminador de luz ultravioleta. El marcador de peso molecular utilizado fue un ADN *ladder* de 100 bp (Takara, Bio, Shiga, Japan).

Los experimentos de RT-PCR se realizaron por duplicado para cada muestra por duplicado y también variando la concentración de RNA utilizado (1 µg/ml y 0,1 µg/ml) con el objetivo de poder establecer la posible sobreexpresión de los sistemas de bombas estudiados. Se considera que existe una sobreexpresión si se observa una intensidad similar entre las dos bandas de 1 µg/ml y 0,1 µg/ml de ARN. En condiciones normales la primera debe ser 10 veces más intensa que la de menor concentración.

## 8.2 Estudio de porinas

La metodología para estudiar la sobreexpresión de porinas fue idéntica a la descrita para las bombas MDR. Los cebadores utilizados para esta ocasión fueron: OprDD: 5'TCCGCAGGTAGCACTCAGTTC3' y OprDR: 5'AAGCCGG ATTCATAGGTGGTG3', dando como resultado un amplificado de 190 pb.

Las condiciones de amplificación de la RT-PCR fueron 30 min a 42°C, 5 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de (30 seg a 94°C / 30 seg a 55°C / 1 min a 72°C) y finalmente un ciclo de 7 min a 72°C. Los resultados de la amplificación se visualizaron en una electroforesis convencional en gel de agarosa.

### 8.3 Resistencia a quinolonas: secuenciación de la región QRDR

Se obtuvieron mutantes espontáneos a ciprofloxacino y en ellos se estudiaron las posibles mutaciones asociadas a la región QRDR. Para ello, se resuspendió un asa de cultivo fresco en placa en 1 ml de agua, diluyéndose a continuación hasta obtener una absorbancia de 0,3-0,4 a 600 nm. Esta dilución nos permitió obtener el ADN molde de la bacteria tras hervirla durante 10 min. Se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min y se recogió el sobrenadante que fue almacenado a -20°C para su posterior utilización.

La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 20 µl, conteniendo los siguientes compuestos: agua destilada, MgCl<sub>2</sub> (25 mM), buffer 10x, cebador A (100 pmol), cebador B (100 pmol) y 2 µl de ADN molde.

Los cebadores utilizados son los que se pueden observar en la tabla 6 así como las condiciones de la PCR. Las condiciones de amplificación de la PCR fueron 3 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de (30 seg a 94°C / 30 seg a la T° de anillamiento/1 min a 72°C) y finalmente un ciclo de 7 min a 72°C.

Para observar los resultados de la amplificación, se tomaron 3 µl de las muestras amplificadas y se sometieron a una electroforesis convencional en geles de agarosa D-1 LOW EEO (Pronadisa) al 2% en TAE 0,5x durante 20 minutos a 100 voltios.

Tabla 6. Cebadores utilizados para amplificar y secuenciar la región QRDR.

Cebadores	Secuencia (5'→3')	Tamaño	T <sup>a</sup> anillamiento
<i>gyrA</i>	AGTCGACGGTTTCCTTTTCCAG	377	55°C
	AGTCCTATCTCGACTACGCGAT		55°C
<i>gyrB</i>	CTGGCGGAAGAAGAAGGTCAACAGCAGGGT	510	63°C
	TGCGGTGGAACAGGAGATGGGCAAGTAC		63°C
<i>parE</i>	CGGCGTTCGTCTCGGGCGTGGTGAAGGA	591	63°C
	TCGAGGGCGTAGTAGATGTCCTTGCCGA		63°C
<i>parC</i>	CGAGCAGGCCTATCTGAACTAT	303	55°C
	GAAGGACTTGGGATCGTCCGGA		55°C

### 9. Ensayos de competición en filtros de nitrocelulosa

Se realizaron experimentos de competición entre parejas isogénicas de cepas normomutadoras (PAO1 y JM105) e hipermutadoras (PAO1 $\Delta$ *mutS* y JM7) para evaluar las ventajas de unas sobre otras en el crecimiento, capacidad de sobrevivir en medios nutricionales adversos y respuesta a la acción de los antimicrobianos.

En la ejecución de los mismos se puso a punto un nuevo modelo de crecimiento que recuerda las condiciones de la biopelícula, empleando filtros de nitrocelulosa. Para los diferentes ensayos de competición se requirió, como primer paso, disponer de un marcador estable con carácter selectivo, que permitiese la diferenciación entre la cepa mutadora y su pareja no mutadora. Para ello, se transformaron las cepas de forma independiente con el plásmido pSMC2 que lleva un marcador de resistencia a tetraciclina (Figura 15).

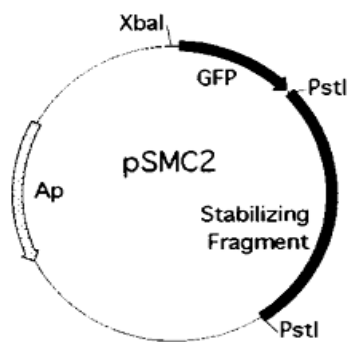


Figura 15. Construcción del plásmido pSMC2.

Se ensayaron todas las combinaciones con los dos pares de cepas en estudio. Se realizaron curvas de crecimiento con lectura de densidad óptica (DO) y recuento bacteriano para descartar cualquier influencia debida a la presencia del plásmido (neutralidad del marcador de resistencia).

Una vez establecidas las condiciones de crecimiento de las diferentes cepas, se desarrollaron modelos empleando filtros de nitrocelulosa (Millipore, 0,45  $\mu\text{m}$ ), que al actuar como soporte inerte permiten el crecimiento simultáneo de las cepas competidoras en una estructura de biopelícula.

Para el ensayo de competición, las parejas de las diferentes cepas se crecieron por separado en caldo LB hasta alcanzar valores de recuento en un rango de  $10^8$  UFC/ml. Posteriormente los cultivos se mezclaron en diferentes proporciones (1:90, 10:90 y 50:50) y finalmente, 200  $\mu\text{l}$  de cada una de las mezclas se depositaron en la superficie de los filtros de nitrocelulosa. A continuación, los filtros se depositaron en diferentes medios sólidos con condiciones variables de aporte o eliminación de nutrientes esenciales (medios mínimos) recreando artificialmente, al menos en forma parcial, ciertas condiciones fisiológicas microambientales del pulmón de los pacientes con FQ.

En todos los experimentos se empleó el medio mínimo M63 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4,5 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  9 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2 g/L y 1 ml de  $\text{MgSO}_4$ ) suplementado con un agregado de alginato (ácido polimanurónico, constituyente esencial de la cápsula de *P. aeruginosa* que actúa como reservorio de nutrientes y de agua) o de dipiridilo (quelante de  $\text{Fe}^{++}$ , elemento esencial para la producción de las piocianinas de *P. aeruginosa*).

En cada experimento se inocularon simultáneamente 5 filtros por cada placa y cada cepa a su vez en tres placas diferentes de M63, M63-alginato y M63-dipiridilo. A las 24 horas de incubación, uno de los filtros de cada placa se retiró y se procedió a su lavado con un volumen de 2 ml de solución salina. Esta suspensión se diluyó y se sembró en placas de LB agar y LB agar con ticarcilina para conocer el recuento de cada una de las cepas tras la competición.

El mismo procedimiento se realizó con los restantes filtros a intervalos diferentes de competición: 48, 72, 96 horas y 7 días (en esos intervalos los filtros se cambiaron a nuevas placas de cultivo). Todos los experimentos se realizaron por triplicado, y en los resultados se expresa la media de los tres valores (Figura 16).

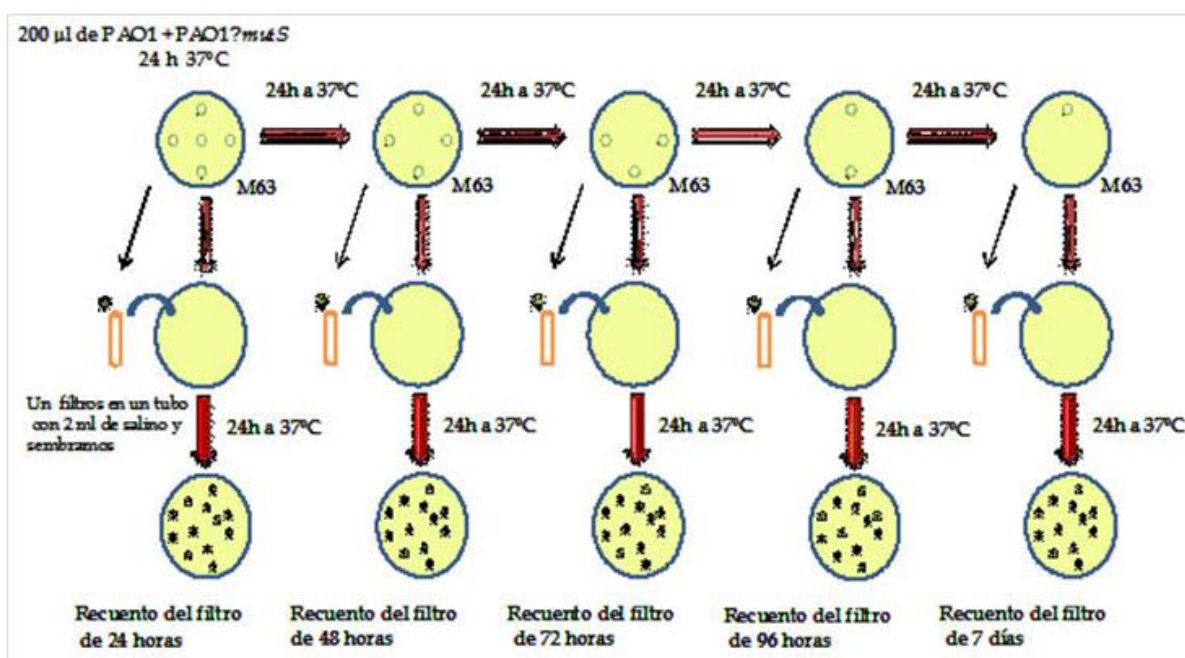


Figura 16. Representación esquemática del procesamiento de los filtros.

Posteriormente se repitieron los ensayos, pero utilizando en este caso el medio M63 suplementado con un antimicrobiano como el ciprofloxacino en un rango de 2 hasta 32 µg/ml. En esta ocasión solo se utilizaron las dos cepas de referencia PAO1 y PAO1 $\Delta$ mutS. En primer lugar, se crecieron las dos cepas por separado hasta alcanzar

una DO<sub>600</sub> de 0,6 y posteriormente se mezclaron en proporciones iguales 50/50. Se procedió al recuento de células viables cada 24 horas.

Una variación a este experimento se realizó traspasando los filtros con PAO1 + PAO1 $\Delta$ *mutS* incubados sin antibiótico durante 24 horas a placas con antibiótico. Esta variación se introdujo con la finalidad de conseguir inicialmente un inóculo suficientemente alto de cada una de las cepas y después introducir el antibiótico. Estas condiciones tratan de asemejar lo que sucede en el pulmón del enfermo con FQ cuando tras un proceso de reagudización bacteriana se comienza el tratamiento con antibiótico.

### **10. Respuesta del sistema inmune innato frente a *P. aeruginosa***

Todos los reactivos utilizados en los ensayos de inmunidad fueron adquiridos en las firmas comerciales Merck (Darmstadt, Alemania), Boehringer (Mannheim, Alemania) y Sigma (San Louis, MO, USA). El medio de cultivo utilizado fue DMEM (Dulbecco's MEM) de Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), suplementado con 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 10% de suero fetal bovino.

En primer lugar se procedió a la obtención de monocitos/macrófagos humanos aislados en sangre periférica a partir de *buffy coats* de donantes sanos facilitados por el Centro de Transfusiones de la Comunidad de Madrid. En un primer paso se aislaron todas las células mononucleares y después se purificaron específicamente los monocitos-macrófagos mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque Plus (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA). Una vez purificada la fracción, las células fueron cultivadas una hora hasta llegar a una densidad de 20x10<sup>6</sup> células/ml. En todos los experimentos se comprobó la homogeneidad de los cultivos analizando la expresión del marcador CD14 mediante citometría de flujo en un Citómetro de Flujo (BD Biociences San José, CA, USA) equipado con un láser de argón de 25 mW.

Por otro lado se preparó el inóculo de las bacterias en crecimiento planctónico y biopelícula. Para estos experimentos se seleccionaron dos cepas isogénicas de origen clínico aisladas de un mismo paciente, citadas previamente página 52 (*P. aeruginosa* JM105 y JM7). El inóculo en condiciones planctónicas se obtuvo a partir de un cultivo O/N en LB caldo que posteriormente se centrifugó y se sonicó en 6 ciclos de 45''.

El inóculo en condiciones de biopelícula se obtuvo a partir de un crecimiento de 3 días a 37°C sobre un filtro de nitrocelulosa colocado en una placa de LB agar. Todas las células que habían crecido en la superficie del filtro se recogieron, centrifugaron y se sonicaron de forma idéntica al inóculo planctónico. De cada inóculo una vez sonicados se añadieron 10 µl al cultivo celular.

Una vez obtenido los cultivos celulares y los inóculos bacterianos, ambos se pusieron en contacto y se incubaron durante 3 y 6 horas a 37°C. Seguidamente se lavaron 3 veces con PBS y se procedió a recoger las células para extraer el ARN total mediante el kit High Pure RNA Isolation (Roche Diagnostic, Mannheim, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Partiendo de 1 µg de este ARN libre de ADN, se sintetizó el ADN complementario con el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Los niveles de expresión de TNFα, IL-12, IL-10, IL-6, IRAK-M y TREM1 se midieron mediante PCR cuantitativa en un equipo Light Cycler de Roche® empleando el kit Quantimix Easy SYG de (Biotools, Madrid, España) utilizando los cebadores recogidos en la tabla 7.

**Tabla 7.** Cebadores utilizados en los experimentos de Q-PCR.

Gen	Cebador (5'→3')	T <sup>a</sup> anillamiento °C
TNFα	AAGAGCTACGAGCTGCCTGACG TCCACATCTGCTGGAAGGTGG	62
IL-6	CAAAGAATTAGATGCAATAA GCCCATTAACAACAACAATCTG	54
IL-12p40	GACATTCAGTGTCAAAGCAGCA CCTTGTGTCCCCTCTGACTCT	52
IL-23p19	GTTCCCCATATCCAGTGTGG GAGGCTTGAATCTGCTGAG	60
IL-10	CCCCAAGCTGAGAACCA TCTCAAGGGGCTGGGTCAGC	68
IRAK-M	TTTGAATGCAGCCAGTCTGA GCATTGCTTATGGAGCCAAT	62
TREM-1	GGACGGAGAGATGCCCAAGAC ACCAGCCAGGAGAATGACAAT	62

El número de copias de cada uno de los genes se determinó utilizando una curva estándar de siete puntos, y los coeficientes de correlación ( $r^2$ ) fueron siempre  $\geq 0,98$ . También se comprobó la especificidad de los productos amplificados mediante las curvas de “melting” que ofrece el aparato de Q-PCR. La presencia de los amplicones se visualizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% con posterior tinción con bromuro de etidio.

### **11. Análisis estadístico**

Los datos que se detallan en la sección de resultados reflejan el valor de la mediana de tres experimentos independientes. Los datos continuos se expresan en valores medios y desviaciones estándar, mientras que los datos categóricos se expresan como frecuencias absolutas y relativas.

En las frecuencias de mutación según las formas de crecimiento planctónico y biopelículas, se utilizó una regresión lineal con la diferencia entre el logaritmo de frecuencia de mutación en biopelícula y en planctónico como la variable dependiente (línea de fondo) y la frecuencia de mutación como la variable independiente.

Las comparaciones emparejadas de los valores de distribución de CMI y CPM entre los dos tipos de crecimiento (biopelícula y planctónico) se realizaron mediante el test de Wilcoxon. Cuando se clasificaron las cepas según sus frecuencias de mutación (hipo, normo o hipermutadoras) se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis con un nivel de significancia de 0,05. En el caso de las comparaciones de parejas se utilizó la corrección de Bonferroni ( $\alpha=0.016$ ).

Para los experimentos de inmunidad innata se utilizaron dos donantes de monocitos/macrófagos y los resultados se expresaron como el valor medio de tres determinaciones para cada sujeto. La significancia en la diferencia de los resultados se analizó mediante el test de la t de Student contemplando una significancia de  $p \leq 0,05$ .



## **Resultados**

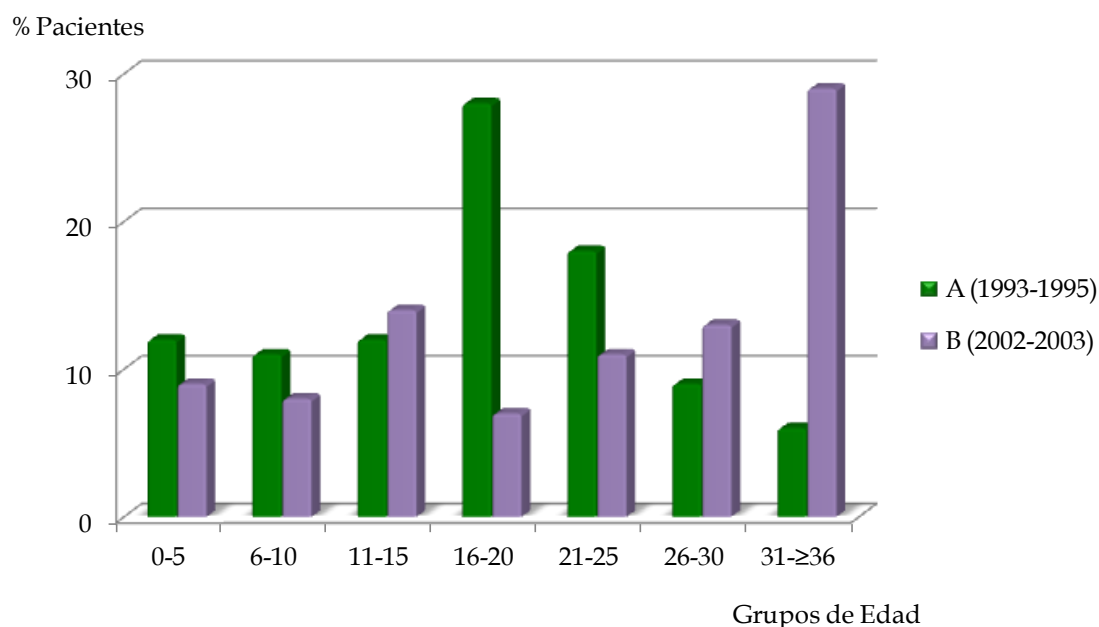


### **1. Colonización broncopulmonar en pacientes de la Unidad de Fibrosis Quística del Hospital Universitario Ramón y Cajal**

A continuación se muestran los resultados obtenidos en el estudio retrospectivo de dos periodos de tiempo separados entre sí 10 años.

#### **1.1. Características de los pacientes**

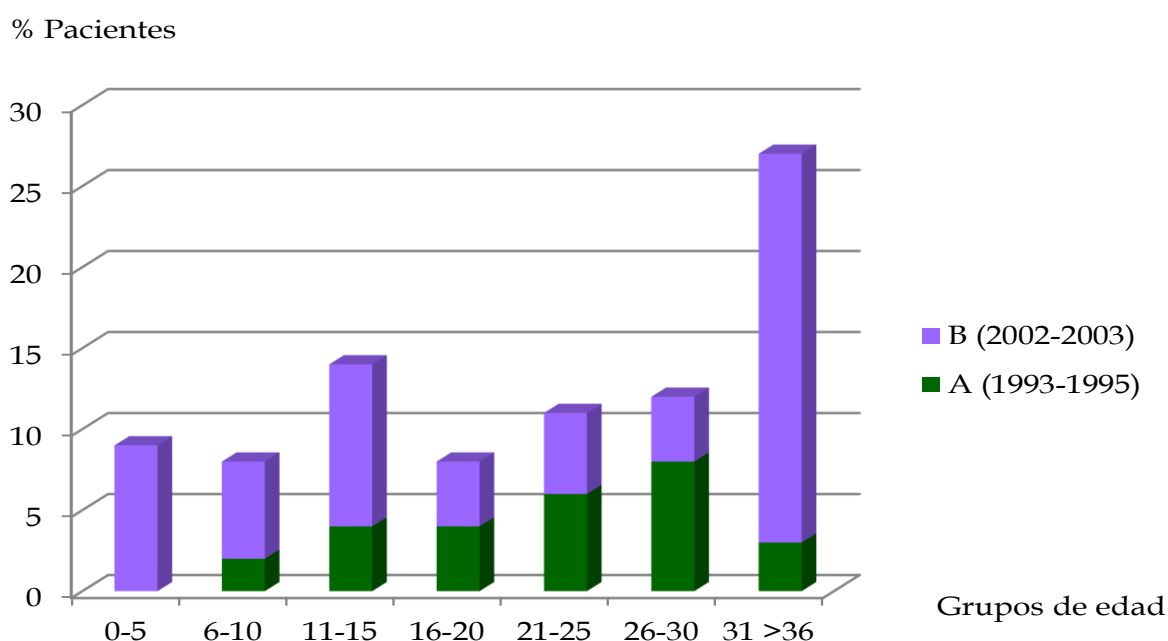
En la Figura 17 se representa la distribución de los pacientes estudiados clasificados por grupos de edad. Los pacientes incluidos en el periodo A tenían una media de edad de 16,9 años y los del periodo B de 25,4 años. Se observó un desplazamiento hacia una mayor edad en los pacientes del segundo periodo, probablemente debido al aumento en la esperanza de vida de estos pacientes y a la incorporación de pacientes nuevos de mayor edad (Figura 17).



**Figura 17.** Distribución por grupos de edad de los pacientes incluidos en los períodos A y B.

En la Figura 18 se muestra la distribución de los pacientes del periodo B clasificados en pacientes antiguos (45% del primer período) y pacientes nuevos.

El 45% de estos pacientes pertenecieron al primer periodo del estudio y continuaron su seguimiento en nuestra Unidad quedando incluidos también en el segundo periodo. El resto de los pacientes del grupo A (55%) no se incluyeron en el B porque cambiaron de centro hospitalario o fallecieron.



**Figura 18.** Distribución de los pacientes del periodo B según si continuaban su seguimiento desde el periodo A (antiguos) o no (nuevos).

### 1.2. Patrón general y evolución de la colonización broncopulmonar

En la Figura 19 se representa la frecuencia de los diferentes patógenos detectados en las muestras respiratorias y según el periodo de estudio. La distribución de los microorganismos fue similar en ambos periodos, aunque con distintos porcentajes. Los dos patógenos mayoritarios fueron *P. aeruginosa* (69,1 y 51,8% periodo A y B, respectivamente) y *S. aureus* (75,3% y 58,2% periodo A y B, respectivamente). El tercer microorganismo en relevancia fue *H. influenza*, y el resto representaron porcentajes muy minoritarios.

% Pacientes colonizados

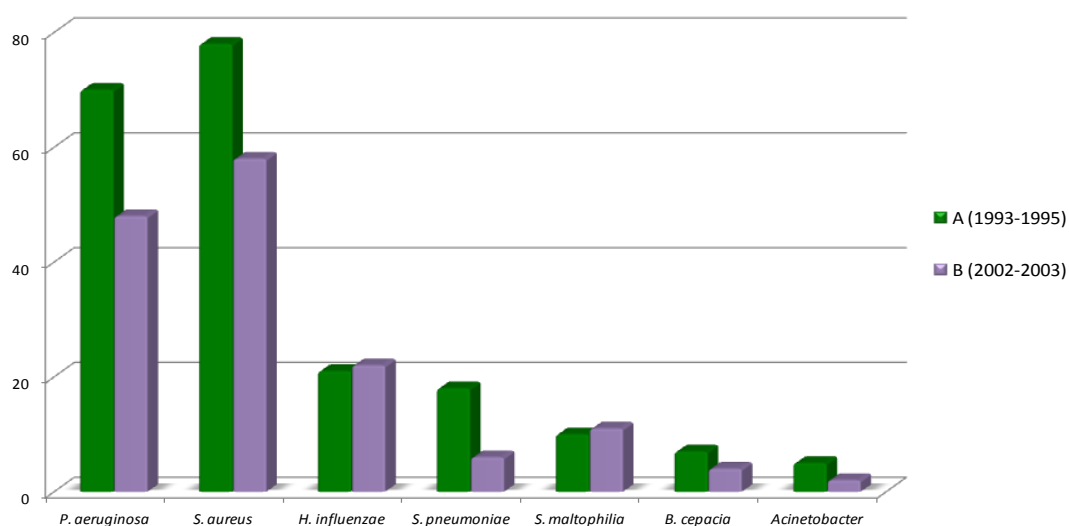


Figura 19. Porcentaje de pacientes colonizados/infectados por diferentes patógenos.

La coexistencia de varios microorganismos es un hecho muy frecuente en el paciente con FQ. En los dos periodos estudiados se observaron porcentajes similares de coinfección para los diferentes microorganismos, excepto en el caso de *S. aureus* y de *H. influenzae*, que aumentaron significativamente en el segundo período, pasando de un 5% a un 27% ( $p < 0,005$ ) (Figura 20).

% Pacientes coinfectados

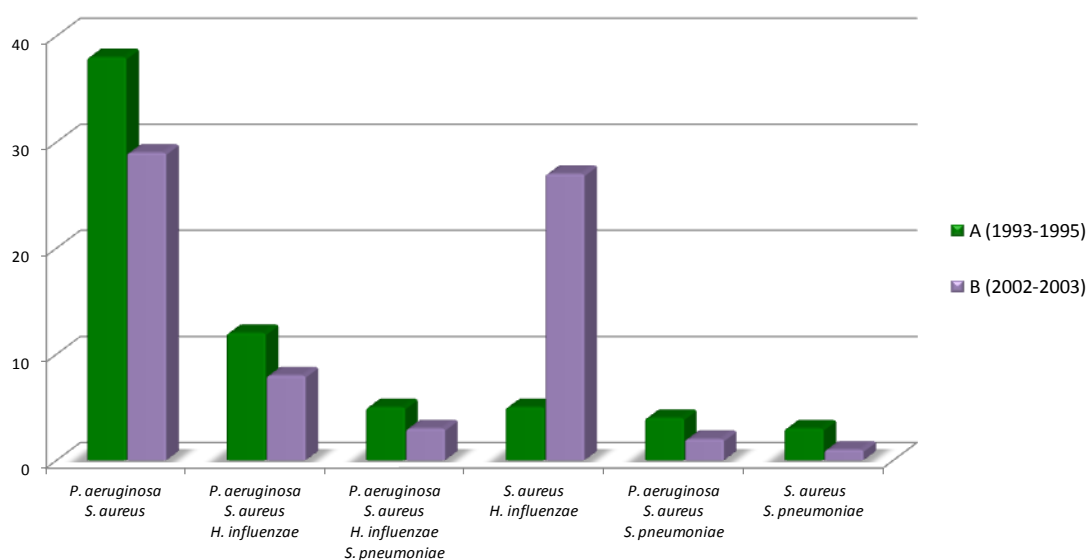


Figura 20. Pacientes colonizados/infectados por más de un patógeno.

Se analizó la distribución de los microorganismos según la edad de los pacientes, estableciéndose para ello diferentes rangos de edades (Figura 21).

En el periodo A, la colonización por *P. aeruginosa* aumentó progresivamente desde los 5 hasta los 16 años, manteniéndose a partir de esta edad en el 80% de los pacientes.

Durante el periodo B se produjo un retraso en la primocolonización de los pacientes hasta los 10 años, existiendo un pico máximo entre los 16 y los 20 años, donde todos los pacientes estaban infectados/colonizados por ese microorganismo. Con posterioridad se produjo una disminución, llegando hasta un 60% de los pacientes.

En el primer periodo, *S. aureus* fue el microorganismo más frecuentemente aislado en los pacientes de menor edad, disminuyendo a medida que aumenta la edad. En el segundo periodo esta disminución no fue tan llamativa y se mantuvo en un porcentaje del 70-80% en los pacientes de mayor edad.

En el caso de *S. pneumoniae*, en el periodo A alcanzó valores del 40% durante los primeros años de vida, disminuyendo con posterioridad. En el segundo periodo (B) de estudio no se objetivó su presencia en edades tempranas mientras que a partir de los 10 años se produjo un aumento considerable.

Para *H. influenzae* se observó en el primer periodo una mayor frecuencia de pacientes infectados/colonizados desde edades tempranas. No obstante, su frecuencia fue disminuyendo a medida que aumentó la edad del paciente. En el segundo periodo, su aislamiento aumentó al final de la primera década de la vida del paciente disminuyendo con posterioridad. El patrón en ambos periodos es similar ya que hay un incremento de pacientes infectados/ colonizados desde las edades tempranas, produciéndose una disminución con posterioridad, aunque en el periodo A la disminución se produjo con anterioridad a la del periodo B.

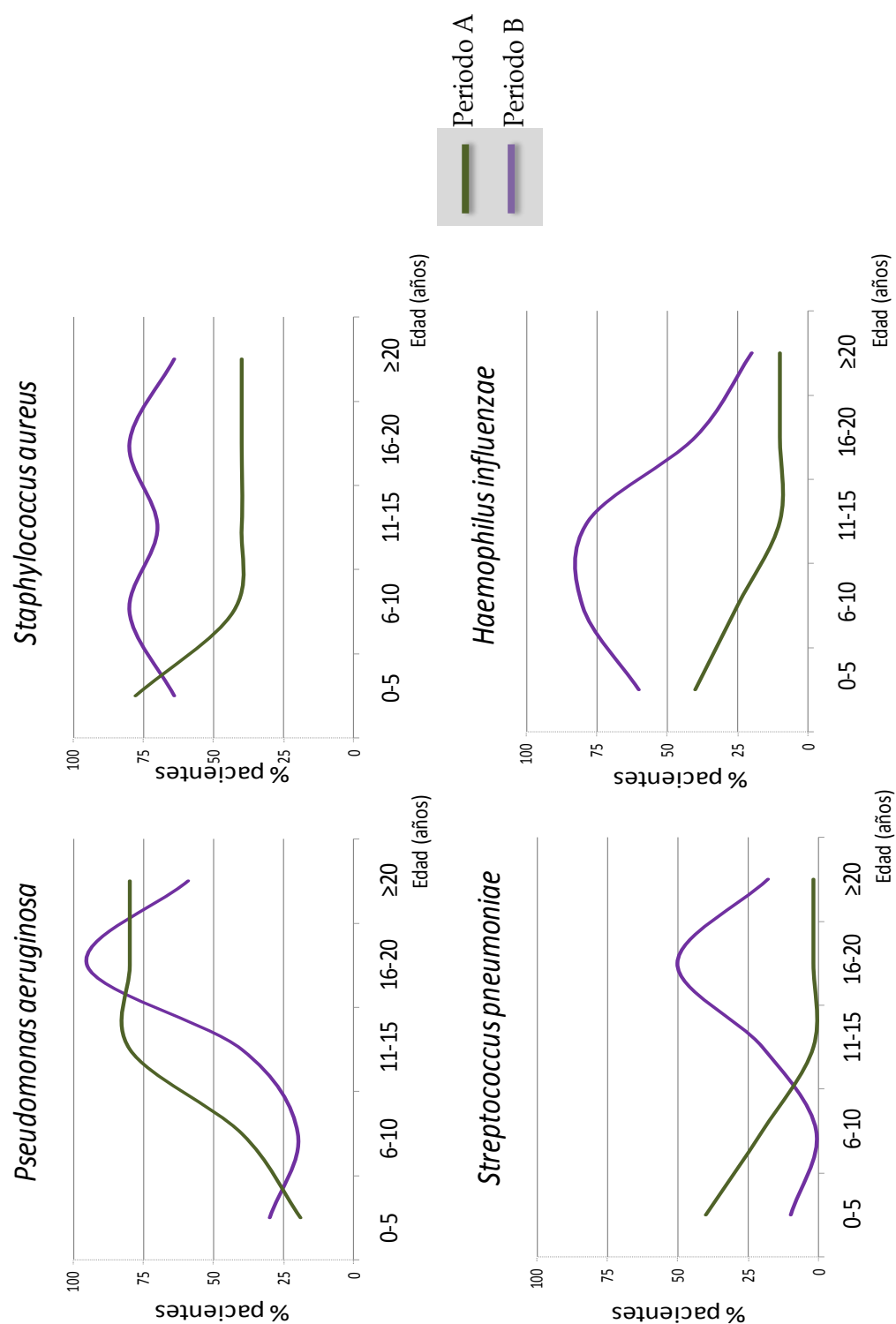


Figura 21. Distribución los principales microorganismos según rango de edad y periodo

### 1.3. *P. aeruginosa* en pacientes con FQ

*P. aeruginosa* se aisló en muestras de esputo de 56 pacientes (69,1%) pertenecientes al período A. Porcentualmente, su frecuencia disminuyó significativamente ( $p=0,03$ ) en el período B donde se aisló de 65 pacientes (51,2%). A continuación se analizan las características morfológicas de los aislados de *P. aeruginosa* recuperados en los cultivos microbiológicos realizados en ambos periodos.

#### 1.3.1. Distribución de morfotipos

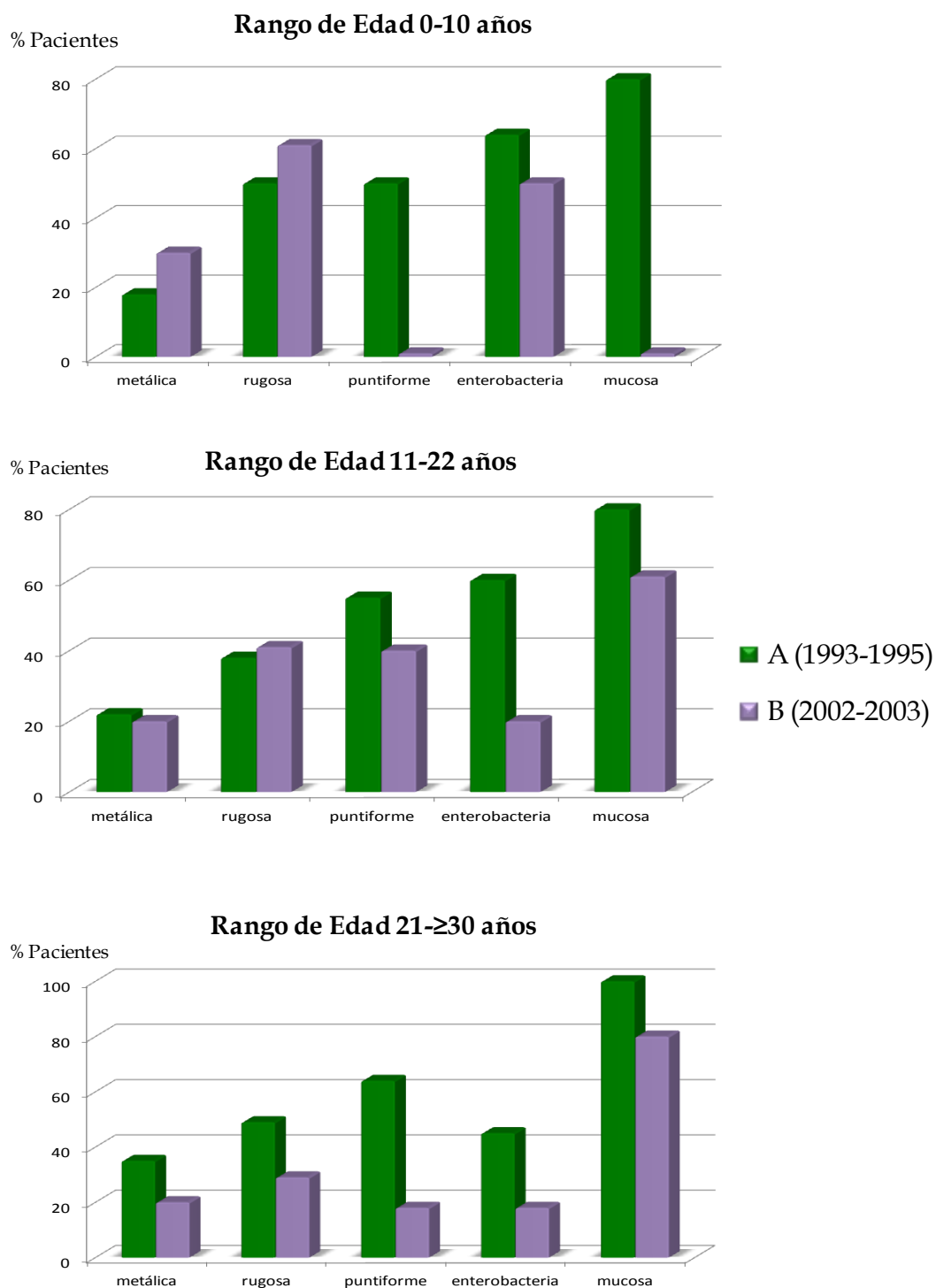
En la figura 22 se incluye la distribución de morfotipos según el rango de edad de los pacientes. En el periodo A de todos los rangos de edades el morfotipo más representado es el mucoso y el menos común el metálico. El 80% de los pacientes de menos de 20 años presentaron un morfotipo mucoso, que pasó a ser el 100% en los mayores de 21 años. Durante el periodo B, en el rango de edad de 0-10 años no se detectó ningún morfotipo mucoso, mientras que estuvo representado en el 60% de los pacientes con un rango de edad de 11 a 20 años. A partir de los 21 años el 80% de los pacientes presentó aislados con morfotipo mucoso. Estos datos serían consecuencia de un menor porcentaje de nuevos pacientes con primocolonización por *P. aeruginosa* durante el segundo periodo de estudio.

Las principales diferencias entre los dos periodos ocurren mayoritariamente en el primer rango de edad (0 a 10 años), ya que se observó una disminución del número de morfotipos por cada paciente y a su vez no se detectaron los morfotipos mucoso y puntiforme en el segundo periodo.

En el segundo grupo de edad, 11-20 años, la distribución de morfotipos fue más homogénea en ambos periodos, excepto en el morfotipo enterobacteriaceo que se detectó tres veces más en los pacientes del periodo A comparado con los del periodo B.

Es interesante resaltar que el 100% de los pacientes del periodo A con edades entre 21 y 30 años estaban colonizados/infectados por *P. aeruginosa* con morfotipo mucoso, mientras que en el periodo B eran el 80%. En la mayoría de estos pacientes, el morfotipo mucoso, coexistía con otros morfotipos.

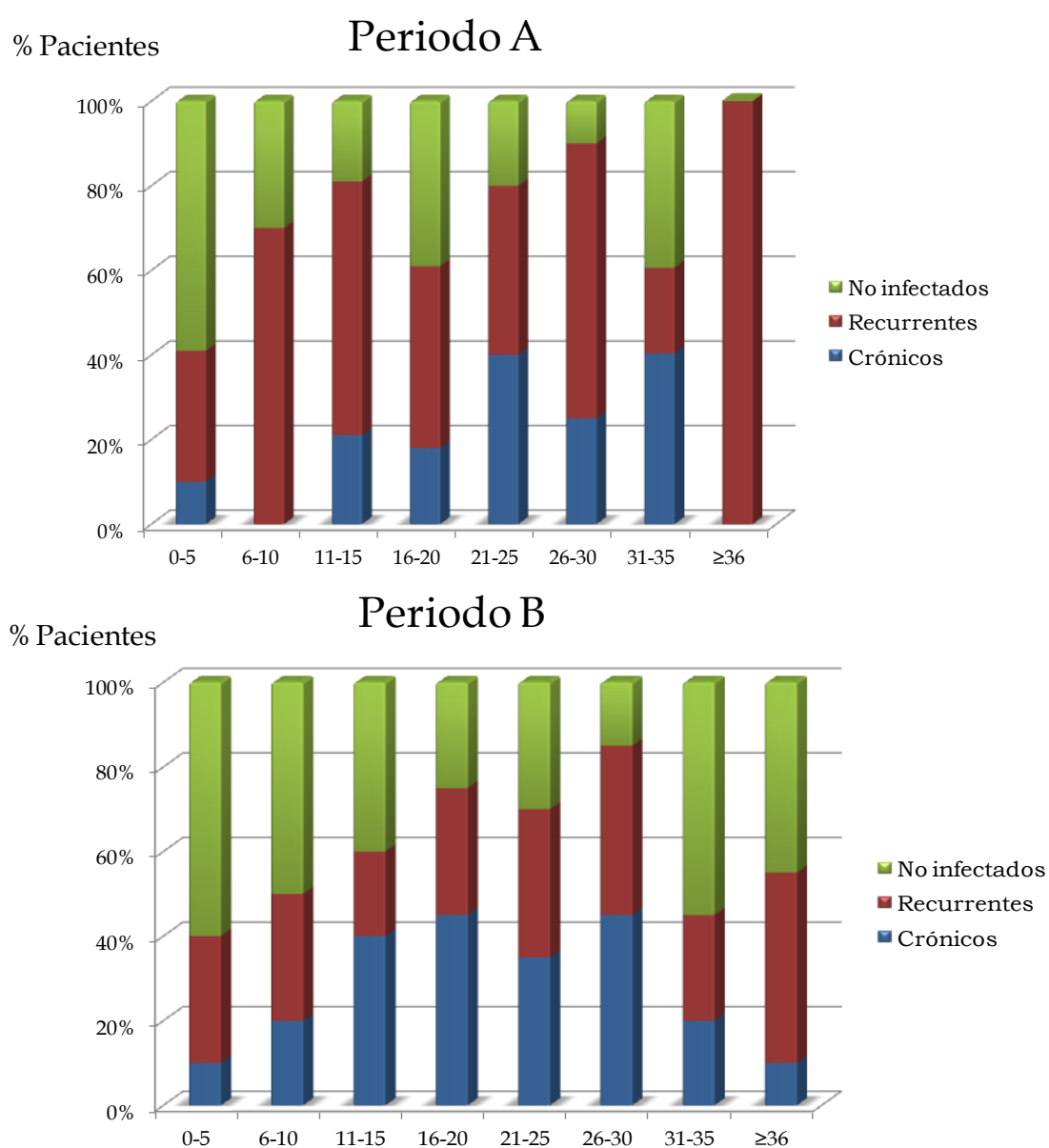




**Figura 22.** Distribución de los diferentes morfotipos de *P. aeruginosa* según los rangos etarios de los pacientes estudiados.

## 1.3.2 Características de la colonización/infección por *P. aeruginosa*

Para el análisis de las tasas de colonización de los diferentes patógenos asociados a FQ y la dinámica de colonización/infección por *P. aeruginosa* se clasificaron los pacientes en diferentes categorías: a) no infectados, b) colonización/infección intermitente (aislamientos repetidos en diferentes años pero con al menos un aislado anual) y c) colonización/infección crónica (más de dos aislamientos al año).



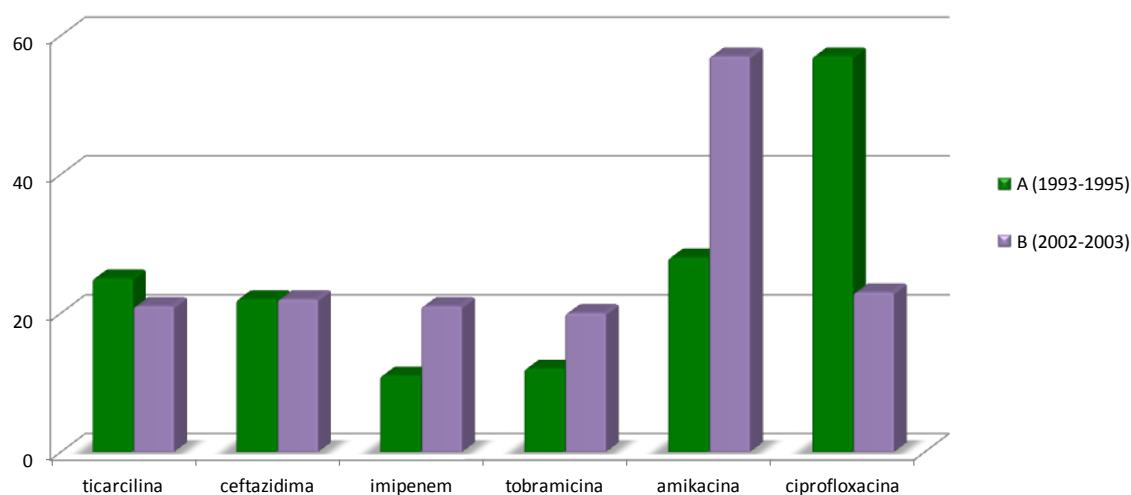
**Figura 23.** Distribución de la colonización por edad.

En el **periodo A** la mayoría de los pacientes no infectados se correspondieron con las edades más tempranas, disminuyendo el estatus de no infectado cuando adquirieron mayor edad. A partir de los 35 años todos los pacientes tuvieron una colonización/infección recurrente.

Durante el **periodo B** y al igual que en el A, en las edades tempranas los pacientes no infectados son mayoría, disminuyendo con la edad. Sin embargo en este periodo a partir de los 35 años sigue existiendo un alto porcentaje de pacientes no infectados (45%) (Figura 23).

### 1.3.3 Patrón de sensibilidad antibiótica de *P. aeruginosa*

Otra característica que se estudió fue la evolución del patrón de sensibilidad antibiótica de las cepas de *P. aeruginosa* aisladas en los dos periodos. Los resultados no mostraron la existencia de diferencias en cuanto a la sensibilidad para ticarcilina y ceftazidima, mientras que el porcentaje de resistencia a imipenem (11% vs 21%), tobramicina (12% vs 20%) y para amikacina (28% vs 57%) aumentó en el segundo período. Las diferencias más notables se detectaron en sentido opuesto para ciprofloxacino (58% vs 23%) ( $p \leq 0,001$ ) (Figura 24).



**Figura 24.** Porcentaje de cepas resistentes a los diferentes antibióticos en los dos periodos.

## 2. Características de los aislados clínicos de *P. aeruginosa*

Para la selección de cepas se utilizaron cuatro criterios: 1) pacientes diferentes; 2) diferentes años; 3) diferentes morfotipos; 4) diferente frecuencia de mutación:

hipomutadoras, normomutadoras y finalmente hipermutadoras. Siguiendo estos criterios, se escogieron 42 cepas de 10 pacientes entre los años 2002 y 2006.

### 2.1. Morfotipos y estructura poblacional

Los aislados se clasificaron en las siguientes categorías en base a su morfotipo: enterobacteria (7 aislados de 3 pacientes), puntiforme (5 aislados de 4 pacientes), metálico (3 aislados de 2 pacientes), rugoso (3 aislados de 3 pacientes) y finalmente el fenotipo mucoso/gelatinoso, que fue el más abundante (24 aislados de 9 pacientes). Todos los pacientes menos uno tenían aislados con morfotipo mucoso.

El análisis de la estructura poblacional mediante campo pulsado (PFGE) de los distintos aislados obtenidos mostró una gran diversidad de patrones observando 18 pulsotipos diferentes (A→R) entre los 42 aislados analizados (Figura 25). En dos ocasiones se detectaron los mismos clones en diferentes pacientes y años (Tabla 8 y 9). En general, los aislados de cada paciente tenían un pulsotipo único, aunque en algunas ocasiones se pudo detectar la coexistencia de varios. Así, el paciente P2 presentó 8 aislados, cuatro de ellos del pulsotipo B, dos del pulsotipo H, un aislado del pulsotipo A y un aislado del pulsotipo L.

En el paciente 6 se obtuvieron 3 aislados correspondientes a 2 pulsotipos (D y K) con tres morfotipos diferentes. Igualmente, el paciente 10 con cuatro aislados en 2002, presentó tres pulsotipos (M, E y J) con tres morfotipos diferentes. En los pacientes 9 y 7 se detectaron 2 aislados con morfotipos diferentes coexistiendo en el mismo espacio temporal. Dos aislados (21 y 38) no se pudieron tipar mediante la técnica de campo pulsado (Figura 26). Con estos resultados podemos decir que existe una gran diversidad genética entre los aislados de *P. aeruginosa* obtenidos de los pacientes con FQ estudiados.

**Tabla 8.** Características de los diferentes pulsotipos detectados.

Pulsotipo	Nº cepas	Paciente	Año	Morfotipo
A	1, 2, 3, 10, 13, 22, 29, 30,	P1	2003	Mucoso
		P2	2004	Metálico
			2006	Puntiforme
B	4, 5, 6, 7, 8	P2	2003	Enterobacteria Mucoso
C	19, 17, 20	P5	2003	Mucoso Puntiforme
D	16, 18, 23	P4	2003	Metálico
		P6		Enterobacteria
E	41, 42	P10	2002	Mucoso Rugoso
F	34, 35	P8	2004,2005	Mucoso
G	27, 28	P4	2006	Mucoso
H	9, 11	P2	2002	Mucoso
			2003	
I	15, 26	P3	2003	Enterobacteria Mucoso
J	37, 39	P9	2004	Mucoso
		P10	2002	Puntiforme
K	24, 25	P6	2006	Puntiforme
				Mucoso
L	14	P2	2002	Enterobacteria
M	40	P10	2002	Enterobacteria
N	32	P7	2003	Rugoso
O	12	P1	2002	Mucoso
P	36	P9	2004	Rugoso
Q	33	P7	2003	Mucoso
R	31	P5	2006	Mucoso

**Tabla 9.** Distribución de los pulsotipos detectados según paciente y año.

Paciente	Sexo	2002	2003	2004	2005	2006
P1	M	O		A		A
P2	F	L,H	B,H,A			
P3	M		I			
P4	M		D			G
P5	M		C			R
P6	F		D			K
P7	M		N,Q			
P8	F			F	F	
P9	M			J,P		
P10	F	J,E,M				

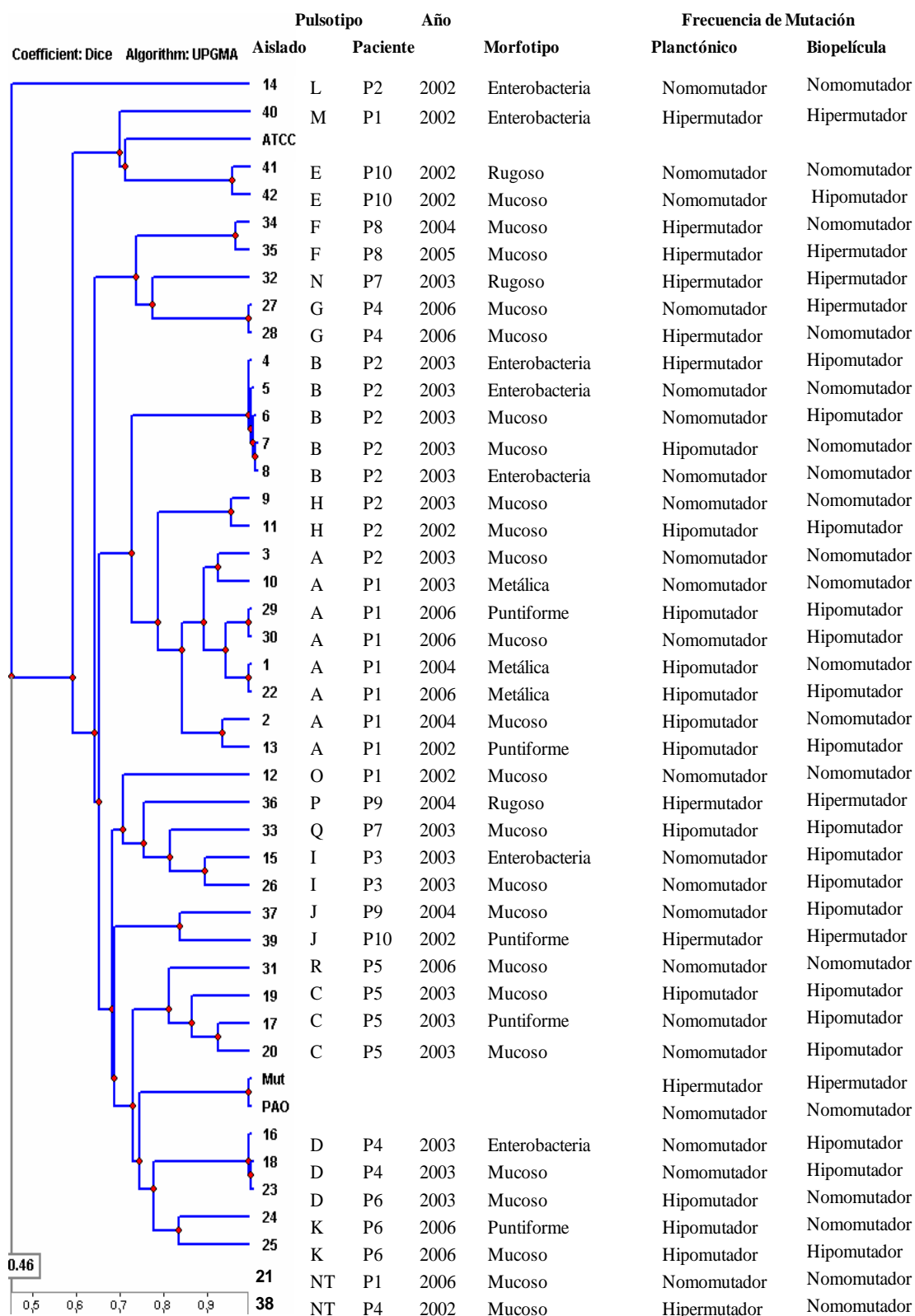
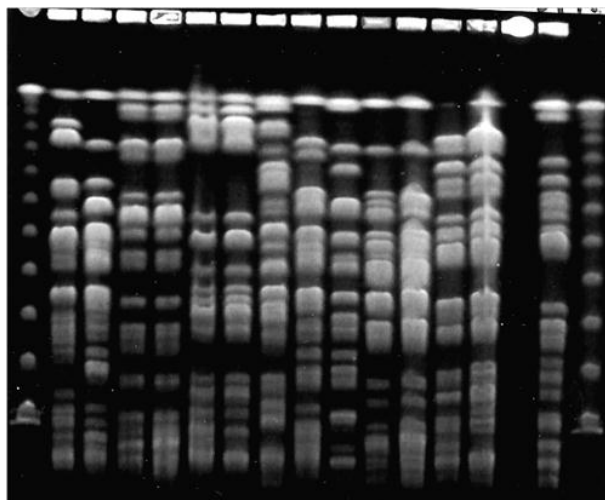


Figura 25. Dendrograma de relación genética de los pulsotipos obtenidos mediante campo pulsado de los aislados de *P. aeruginosa*.

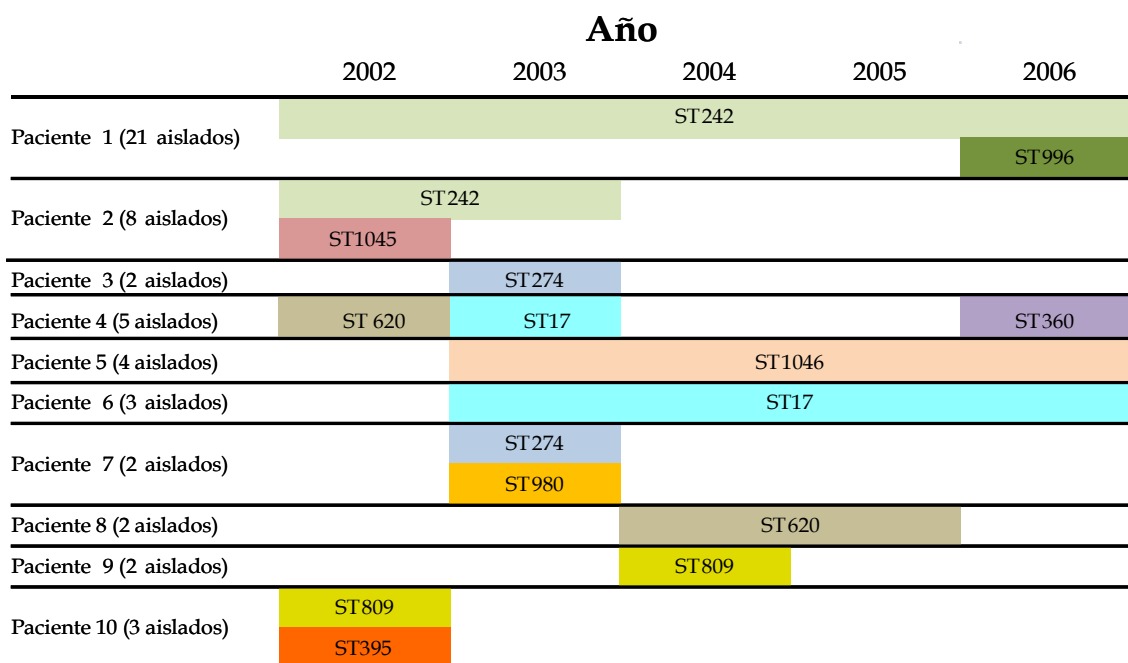


**Figura 26.** Gel de campo pulsado utilizando la enzima de restricción *SpeI* de diferentes aislados clínicos de *P. aeruginosa*.

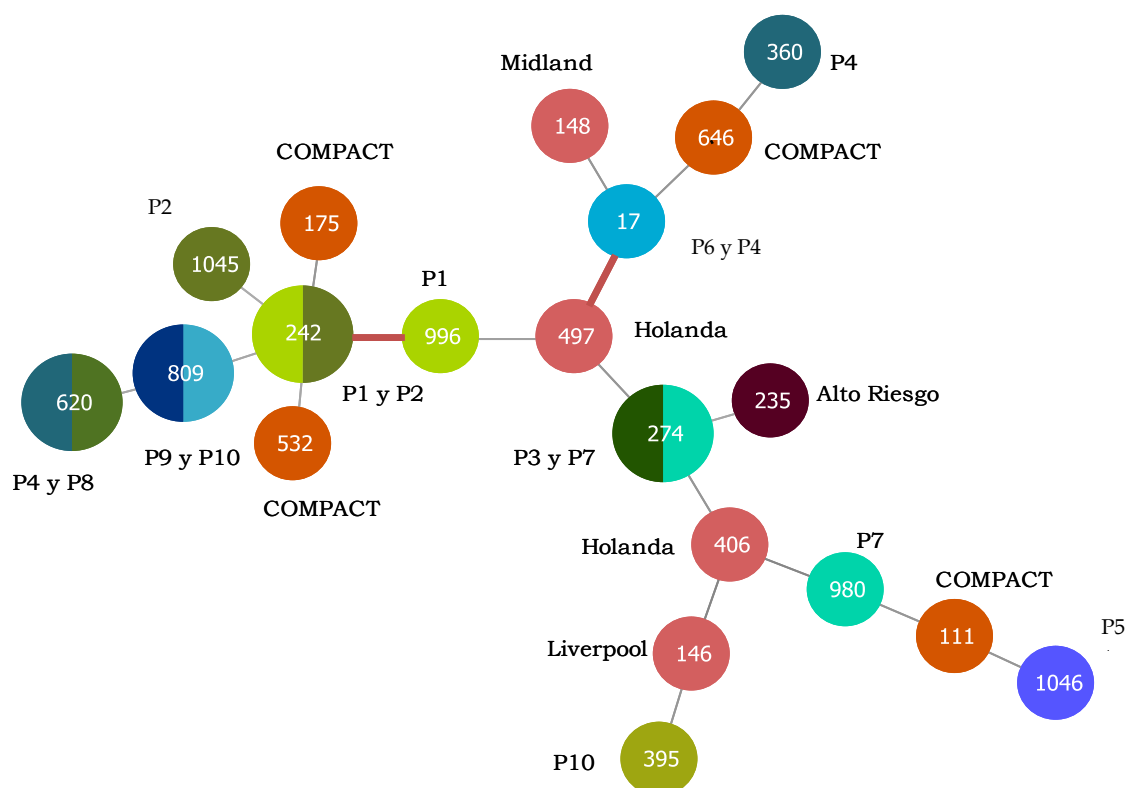
Dentro de las 42 cepas de nuestro estudio, se seleccionaron 22 para aplicar la técnica de MLST (al menos 1 aislado por paciente y por pulsotipo), incluyendo los no tipificables (aislados 21 y 38).

Los resultados mostraron nuevamente una alta diversidad genética detectándose 11 STs (secuencias tipo) diferentes. Dentro de todas las STs detectadas, la más prevalente fue ST242 que se detectó en 4 aislados de 2 pacientes. Por otra parte, ST17 y ST809 agruparon 3 aislados cada uno, mientras que ST620, ST395 y ST274 se identificaron en 2 aislados. El resto de STs, ST996, ST360, y ST980, estaban representadas por un único aislado. Además, se detectaron dos nuevos STs que no estaban previamente incluidos en la base de datos: ST1046 (1 aislado) y ST1045 (2 aislados de un mismo paciente) (Figura 27, 28 y 29).



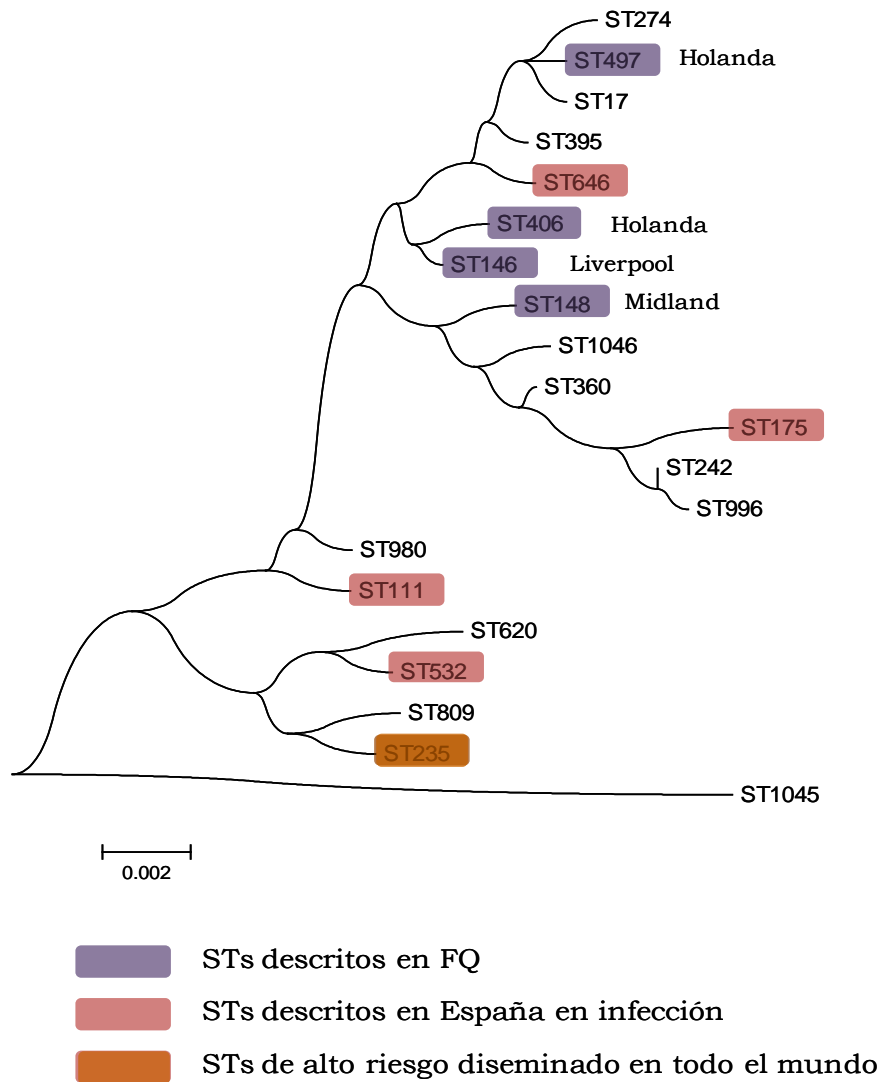


**Figura 27.** Distribución en el tiempo de los diferentes STs detectados en los pacientes con FQ.



**Figura 28.** *Minimum Spanning Tree* (MST) utilizando goeBURST de la estructura poblacional de los principales clones descritos en FQ, de las muestras clínicas de los hospitales españoles, el clon epidémico ST235 y las cepas de nuestro estudio (P1 a P10). La línea roja representa un *single locus variant* (SLV).

Se comparó la relación genética de nuestras cepas con las que previamente habían sido descritas en individuos con FQ (Clon Liverpool ST146, Clon Manchester ST148 y los clones Holandeses ST406 y ST497), con el linaje epidémico BG11 (ST235) diseminado a nivel mundial y con el estudio multicentrico COMPACT (estudio en el que participaron 16 hospitales españoles) y en el que se recogieron aislados de *P. aeruginosa* resistente a carbapenems (Figura 29).



**Figura 29.** Árbol filogenético de las secuencias nucleotídicas concatenadas de los siete alelos secuenciados en la técnica de MLST utilizando el software MEGA 5.0. Se han incluido otros STs descritos en FQ así como los principales ST descritos en infecciones no-FQ en España.

El resultado más importante de estos análisis es que en el Paciente 1 coexisten dos STs que son *single locus variant*: ST242 y ST996 que sólo se diferencian en el alelo *mutL*. Ante estos resultados, y previa autorización por parte del Comité Ético de nuestro Hospital, se revisó la historia clínica de este paciente. En ella se comprobó la gran cantidad de antibióticos que había recibido debido a su difícil manejo y sus continuas exacerbaciones hasta su fallecimiento en el año 2008. De hecho, en los últimos tres años de su vida recibió tratamiento intravenoso con antimicrobianos de amplio espectro durante un promedio de 270 días al año. Con los resultados obtenidos mediante la técnica de MLST, se analizaron retrospectivamente 21 cepas de este paciente. Todas presentaban el mismo patrón de PFGE y 18 de ellas se agrupaban en ST242, mientras que tres de ellas aisladas en los años 2007-2008 correspondían a ST996 (Figura 30). A la vista de estos resultados, surgió la hipótesis de que se había producido un evento de deriva genética *in vivo*. Esta evolución ocurrió mediante dos mutaciones en el gen *mutL*: 554<sub>G→A</sub> y 929<sub>A→T</sub> (Figura 31). La cepa 13 (ST242) es hipomutadora, tiene un morfotipo puntiforme y fue aislada en el año 2002; mientras que la cepa 21 (ST996) corresponde al año 2006, tiene un morfotipo mucoso y es normomutadora.

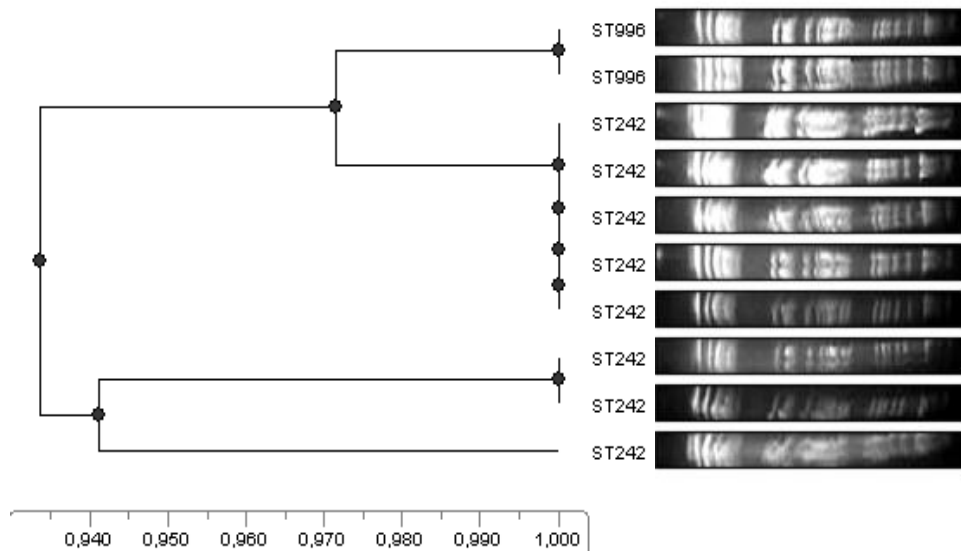


Figura 30. Dendrograma basado en el coeficiente de similitud de Dice.

## A. Secuencia nucleotídica

```

mut-11      CTGCAGGAAGTCATCAAGCGCCTGGCGCTGGCCCGTTTCGACGTGGCTTTCCACCTGCGC 60
mut-44      CTGCAGGAAGTCATCAAGCGCCTGGCGCTGGCCCGTTTCGACGTGGCTTTCCACCTGCGC 60
            *****

mut-11      CACAACGGCAAGACCATCTTCGCCCTGCACGAGGCGCGAGACGAGCTGGCCCGCGCGCGC 120
mut-44      CACAACGGCAAGACCATCTTCGCCCTGCACGAGGCGCGAGACGAGCTGGCCCGCGCGCGC 120
            *****

mut-11      CGGGTCGGCGCGGTGTGCGGCCAGGCATTTCCTCGAGCAGGCGCTGCCGATCGAGGTCGAG 180
mut-44      CGGGTCGGCGCGGTGTGCGGCCAGGCATTTCCTCGAGCAGGCGCTGCCGATCGAGGTCGAG 180
            *****

mut-11      CGCAACGGCCTGCACCTGTGGGGTTGGGTCGGCTTGCCGACCTTCTCCCGCAGCCAGCCG 240
mut-44      CGCAACGGCCTGCACCTGTGGGGTTGGGTCGGCTTGCCGACCTTCTCCCGCAGCCAGCCG 240
            *****

mut-11      GACCTGCAGTACTTCTATGTGAACGGGCGCATGGTGCGCGACAAGCTGGTCGCCACGCG 300
mut-44      GACCTGCAGTACTTCTATGTGAACGGGCGCATGGTGCGCGACAAGCTGGTCGCCACGCG 300
            *****

mut-11      GTGCGCCAGGCTTATCGCGACGTGCTGTACAACGGCCGGCATCCGACCTTCGTGCTGTTT 360
mut-44      GTGCGCCAGGCTTATCGCGACGTGCTGTACAACGGCCGGCATCCGACCTTCGTGCTGTTT 360
            *****

mut-11      TTCGAAGTCGATCCGCGCGGTGGTGGACGTCAACGTGCACCCGACCAAGCAGCAAGTTCGC 420
mut-44      TTCGAAGTCGATCCGCGCGGTGGTGGACGTCAACGTGCACCCGACCAAGCAGCAAGTTCGC 420
            *****

mut-11      TTCCGTGACAGCCGGATGGTCC 442
mut-44      TTCCGTGACAGCCGGATGGTCC 442
            *****

```

## B. Secuencia aminoacídica

```

mut-11      LQEVIKRLALARFDVAFHLRHNGKTIFALHEARDELARARRVGAVCGQAFLEQALPIEVE 60
mut-44      LQEVIKRLALARFDVAFHLRHNGKTIFALHEARDELARARRVGAVCGQAFLEQALPIEVE 60
            *****

mut-11      RNLHLWGWGLPTFSRSQPDLYFYVNGRMVRDKLVHAVRQAYRDVLYNGRHPTFVLF 120
mut-44      RNLHLWGWGLPTFSRSQPDLYFYVNGRMVRDKLVHAVRQAYRDVLYNGRHPTFVLF 120
            *****

mut-11      FEVDPAVVDVNVHPTKHEVFRD SRMV 147
mut-44      FEVDPAVVDVNVHPTMHEVFRD SRMV 147
            *****

```

**Figura 31.** Comparación de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de los alelos *mutL*-11 y *mutL* -44 obtenidos en ST242 y ST996, respectivamente.

## 2.2. Frecuencia de mutación

Determinamos la frecuencia de mutación de las 42 cepas clínicas seleccionadas utilizando un inóculo de crecimiento planctónico. Una vez analizada la distribución de los resultados y de acuerdo con lo publicado anteriormente, se establecieron tres categorías según su distribución: hipomutadoras ( $5 \times 10^{-10}$  –  $5 \times 10^{-9}$ ), normomutadoras ( $7,5 \times 10^{-9}$  –  $7,5 \times 10^{-8}$ ) e hipermutadoras ( $1 \times 10^{-7}$  –  $5 \times 10^{-6}$ ) (Figura 32).

De las 42 cepas, 13 presentaron un fenotipo hipomutador (31%); 21 cepas un fenotipo normomutador (50%) y finalmente 8 cepas un fenotipo hipermutador (19%). El rango de frecuencia de mutación fue de  $10^{-6}$  hasta  $10^{-9}$ . En la figura 33 se representa la distribución de estos aislados respecto de su frecuencia de mutación.

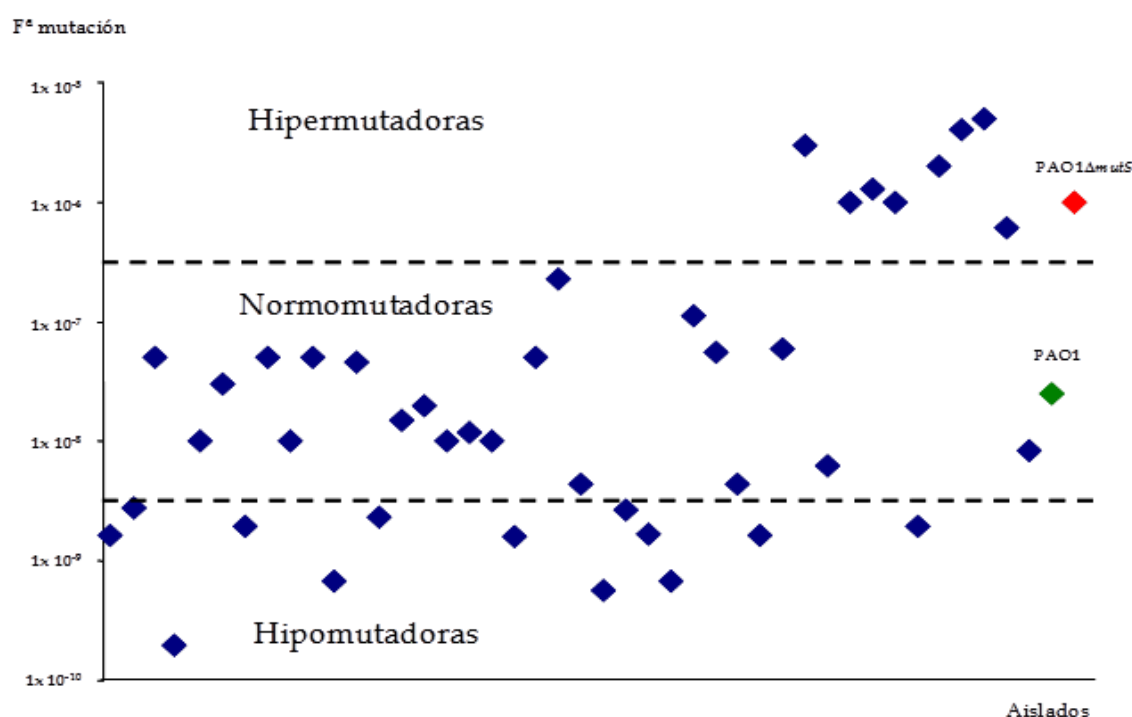
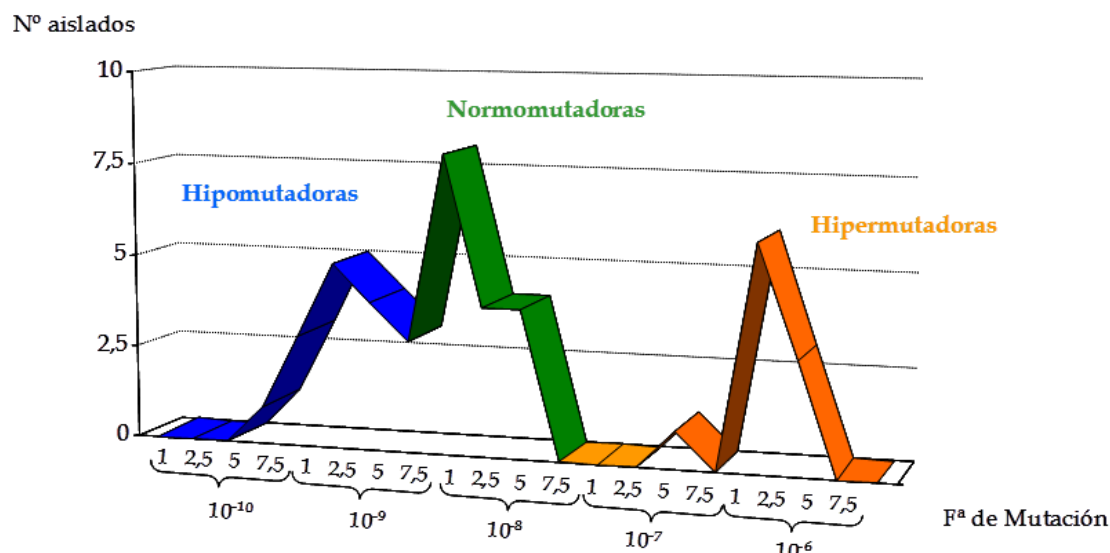


Figura 32. Distribución de los aislados de *P. aeruginosa* según su frecuencia de mutación.



**Figura 33.** Distribución de cepas según su frecuencia de mutación en condiciones de crecimiento planctónico.

Las 13 cepas hipomutadoras procedían de 5 pacientes diferentes y se agrupaban en 7 pulsotipos. Las 21 cepas normomutadoras fueron aisladas de 6 pacientes y presentaban 12 pulsotipos diferentes y una cepa que fue no tipable mediante PFGE. Finalmente, las 8 cepas consideradas hipermutadoras procedían de 5 pacientes y se agruparon en 6 pulsotipos y una cepa aislada no tipable. Cuando se analizó la frecuencia de mutación según el morfotipo de las cepas no se encontró ninguna correlación.

### 2.3. Frecuencia de mutación en biopelículas

Nuevamente se analizaron las frecuencias de mutación en la misma colección representativa de aislados de *P. aeruginosa*, utilizando en esta ocasión un inóculo de crecimiento en biopelícula, según se detalla en Material y Métodos. Con estas condiciones se obtuvo un rango de valores entre  $3,3 \times 10^{-6}$  y  $3,3 \times 10^{-9}$ , siendo el valor medio de todas las cepas  $2,7 \times 10^{-7}$ . Los valores obtenidos previamente en crecimiento planctónico fueron (rango:  $5 \times 10^{-6}$  –  $6,2 \times 10^{-10}$ , media:  $4,8 \times 10^{-7}$ ). Para las cepas control PAO1 y PAO1 $\Delta$ mutS los valores de frecuencia de mutación en crecimiento planctónico fueron  $2,5 \times 10^{-8}$  y  $1 \times 10^{-6}$ , respectivamente. Para el crecimiento en biopelículas fue  $7,9 \times 10^{-9}$ .

para PAO1 y  $8 \times 10^{-7}$  para PAO1 $\Delta$ mutS. Con estos datos se deduce que según el tipo de crecimiento la frecuencia de mutación puede variar.

En crecimiento en biopelículas los resultados mostraron que 18 cepas eran hipomutadoras (43%), 13 cepas normomutadoras (31%) y finalmente 11 cepas hipermutadoras (26%) (Figura 34). Al comparar los tipos de crecimiento se diferenciaron dos comportamientos: las cepas que en crecimiento planctónico se clasificaron como hipomutadoras, aumentaron significativamente sus frecuencias de mutación en biopelículas, mientras que las cepas clasificadas como normo e hipermutadoras, disminuyeron su frecuencia cuando se utilizó como inóculo la biopelícula (Figura 35). Estos resultados demuestran que las frecuencias de mutación en biopelículas están dentro del rango de la normomutación (Figura 36).

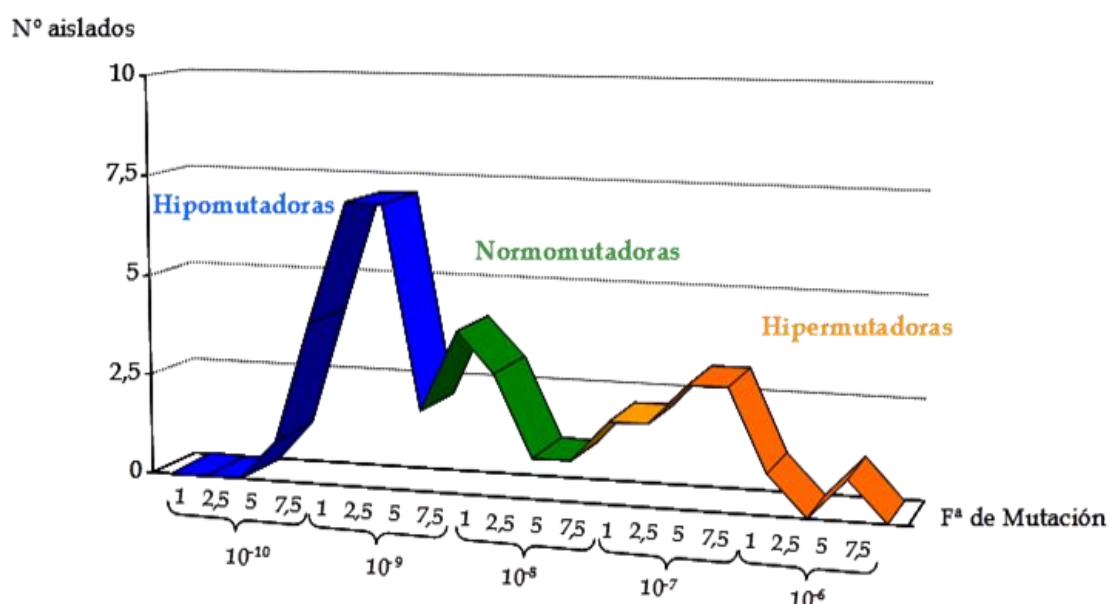
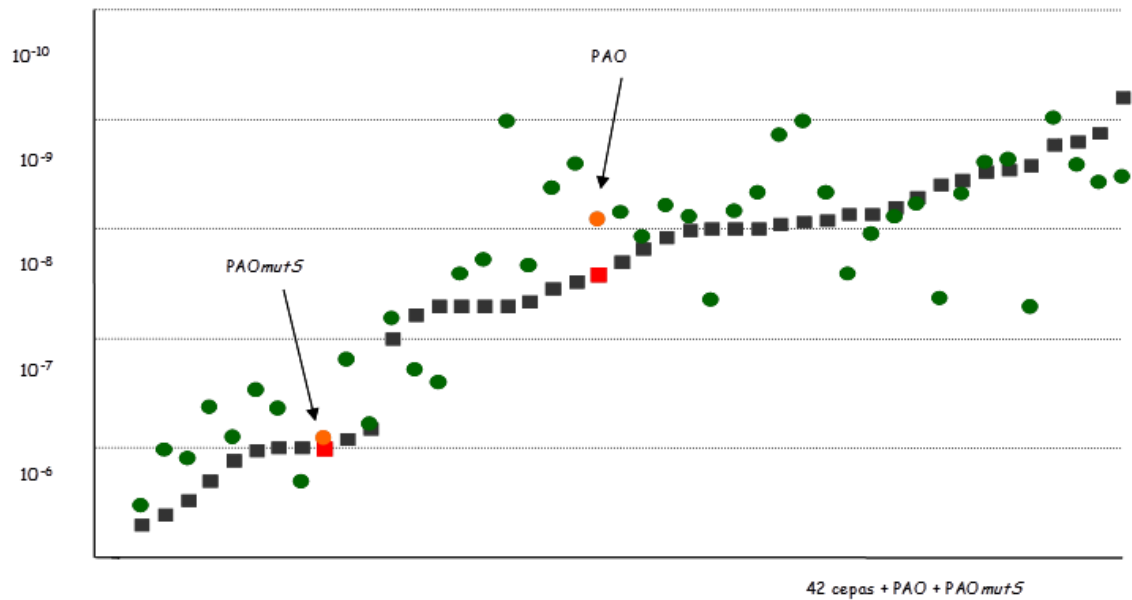
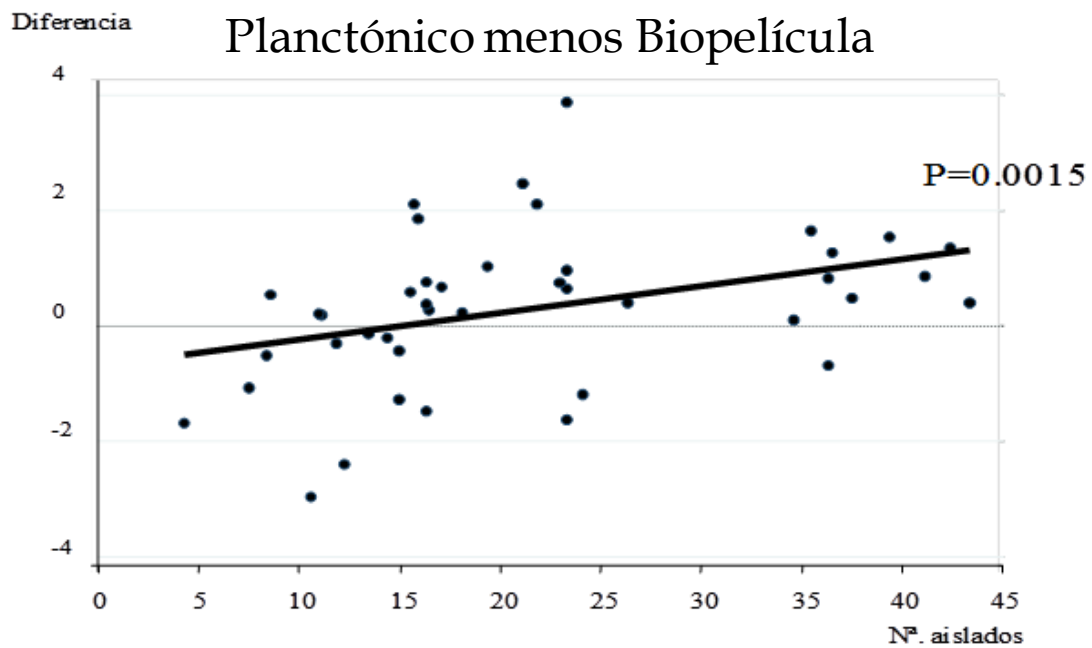


Figura 34. Distribución de cepas según frecuencia de mutación en condiciones de crecimiento en biopelícula.



**Figura 35.** Frecuencia de mutación en crecimiento planctónico (negro) y en biopelícula (verde) de las cepas clínicas y controles (planctónico en rojo y biopelícula en naranja). En cepas clínicas y cepas control



**Figura 36.** Diferencia entre los valores de la frecuencia de mutación para crecimiento planctónico y en biopelículas.



Finalmente, también se analizaron las posibles diferencias de la frecuencia de mutación según el morfotipo y pulsotipo de cada uno de los aislados, aunque no se encontró ningún tipo de relación tras dicha confirmación (datos no mostrados).

#### **2.4. Sensibilidad antibiótica**

Se evidenció que existe discrepancia entre los valores de CMI según el método utilizado, existiendo un desplazamiento hacia concentraciones superiores cuando se realiza la técnica de microdilución. En el caso de la técnica de Etest®, el comportamiento no fue homogéneo y dependió del antibiótico utilizado (Tabla 10).

**Tabla 10.** Valores de sensibilidad antibiótica para las 42 cepas de *P. aeruginosa* utilizando tres métodos

Concentración Mínima Inhibitoria (µg/ml)														%												
≤0,125 0,25 0,5 1 2 4 8 16 32 64 128 256 512														CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	S	I	R								
Ciprofloxacino														≤1	2	≥4										
Etest®	4	7	12	7	8	1	1								1	4										
	Dilución en																									
agar	39														2	1			0,25	0,25	93	7				
Microdilución	1	2	14	8	7	8	2								4	16	7	33	60							
Tobramicina														≤4	8	≥16										
Etest®	3	6	18	10	4	1								2	8											
	Dilución en																									
agar	9														10	13	5	5			8	32	45	31	24	
Microdilución	4	5	12	15	2	4								16	32	22	28	50								
Imipenem														≤4	8	≥16										
Etest®	1	1	4	8	7	8	2	2								9	8	512								
	Dilución en																									
agar	8														4	6	3	11	10			16	32	43	7	50
Microdilución	1	7	5	13	8	5	3								32	64	19	12	69							
Ceftazidima														≤8	16	≥32										
Etest®	7	9	8	5	3	4	2								8	4	64									
	Dilución en																									
agar	2														12	5	10	13			32	64	33	12	55	
Microdilución	4	8	12	8	2	4	1	3			16	128	28	28	44											

En la tabla 11 se muestran los resultados de sensibilidad de las cepas control ATCC 27853, PAO1 y PAO1 $\Delta$ mutS obtenidos mediante las técnicas de Etest®, la dilución en agar y la microdilución para ciprofloxacino, tobramicina, imipenem y ceftazidima.

**Tabla 11.** Resultados de los ensayos de sensibilidad para las cepas control.

	PAO1	PAO1 $\Delta$ mutS	ATCC27853
<b><u>Ciprofloxacino</u></b>			
Etest®	0,25	0,38	0,094
Dilución en agar	0,25	0,25	0,5
Microdilución	1	1	0,25
<b><u>Tobramicina</u></b>			
Etest®	0,5	1,5	0,5
Dilución en agar	1	4	4
Microdilución	2	8	1
<b><u>Imipenem</u></b>			
Etest®	1,5	1,5	2
Dilución en agar	4	8	8
Microdilución	8	8	4
<b><u>Ceftazidima</u></b>			
Etest®	0,38	0,38	0,75
Dilución en agar	$\geq 1024$	$\geq 1024$	$\geq 64$
Microdilución	4	8	2

## 2.5. Sensibilidad antibiótica en biopelículas

Los 42 aislados y las tres cepas control fueron capaces de crecer en biopelícula en las condiciones establecidas, por lo que se analizó su sensibilidad antibiótica en este tipo de crecimiento (Tabla 12 y 13 respectivamente).

En los estudios de sensibilidad antibiótica se observó que la cepa PAO1 presenta valores de CMI iguales a la cepa control ATCC 27853 para todos los antibióticos. Ambas cepas carecen de mecanismos de resistencia adquiridos.

Comparando los valores obtenidos con las cepas PAO1 y PAO1 $\Delta$ *mutS* se observó que el valor de CMI para todos los antibióticos fue igual ó 1 dilución entre ambos, excepto para la tobramicina cuya CMI fue mayor 2 diluciones frente a la cepa PAO1 $\Delta$ *mutS*. Al analizar los valores de CMI-Biofilm se observó un comportamiento similar (Tabla 12).

Para la cepa PAO1 se observó que los valores de CMI-Biopelícula fueron más elevados que los de CMI convencional para todos los antibióticos excepto para ciprofloxacino y levofloxacino donde ambos valores fueron iguales.

La diferencia más importante se observó con azitromicina, ya que sus valores de CMI-Biopelícula fueron más bajos que los de CMI. Para los valores bactericidas (CMB y CMB-Biopelícula) se observó que la CMB-B fue más superior en todos los casos. Para la cepa PAO1 $\Delta$ *mutS* todos los valores en biopelículas fueron más elevados (CMI-B y CMB-B) (Tabla12).

**Tabla 12.** Actividad inhibitoria y bactericida convencionales (CMI y CMB) y en biopelículas (CMI-B y CMB-B) para las cepas controles.

Antibiótico		Concentración (µg/ml)		
		ATCC 27853	PAO1	PAO1Δ <i>mutS</i>
<b>Ceftazidima</b>	CMI	2	2	4
	CMB	64	16	128
	CMI-B	256	>1024	1024
	CMB-B	1024	>1024	1024
<b>Imipenem</b>	CMI	4	4	8
	CMB	32	32	128
	CMI-B	64	128	128
	CMB-B	256	256	256
<b>Tobramicina</b>	CMI	1	1	4
	CMB	16	8	16
	CMI-B	4	4	16
	CMB-B	16	16	32
<b>Ciprofloxacino</b>	CMI	0.25	0.25	0.25
	CMB	2	0.5	2
	CMI-B	2	0.25	0.5
	CMB-B	32	4	32
<b>Levofloxacino</b>	CMI	1	1	2
	CMB	4	2	4
	CMI-B	4	1	4
	CMB-B	32	8	16
<b>Tetraciclina</b>	CMI	32	32	32
	CMB	256	512	512
	CMI-B	256	512	512
	CMB-B	2048	>1024	>1024
<b>Colistina</b>	CMI	2	1	1
	CMB	4	16	64
	CMI-B	32	32	64
	CMB-B	32	32	32
<b>Azitromicina</b>	CMI	64	64	64
	CMB	128	64	64
	CMI-B	16	32	256
	CMB-B	256	>256	>256

En la Tabla 13 se observa la actividad inhibitoria y bactericida convencionales (CMI y CMB) y en biopelículas (CMI-B y CMB-B) de los diferentes antimicrobianos estudiados frente a la colección de cepas clínicas de *P. aeruginosa*.

Se observó que para ceftazidima, imipemen, tobramicina, ciprofloxacino, tetraciclina y colistina el valor de CMI fue menor que el de CMI-B, siguiendo el mismo patrón con los valores de CMB y CMB-B. Estos datos indican que la concentración de antibiótico que se requería para erradicar la bacteria al crecer en biopelículas sería más elevada que con crecimiento planctónico.

Sin embargo, en dos antimicrobianos el comportamiento fue diferente: levofloxacino donde las concentraciones de CMI y CMI-B son prácticamente iguales y azitromicina para el que los valores de CMI fueron mucho más elevados que la CMI-B y los valores de CMB y CMB-B fueron iguales.

**Tabla 13.** Actividad inhibitoria y bactericida convencionales (CMI y CMB) y en biopelículas (CMI-B y CMB-B) para las clínicas estudiadas.

Antimicrobiano		Concentración (µg/ml)			
		Rango	50	90	Media geométrica
<b>Ceftazidima</b>	CMI	2-128	16	128	22,4
	CMB	32-512	256	512	132,4
	CMI-B	2->1024	512	1024	195,3
	CMB-B	8-2048	1024	1024	794,6
<b>Imipenem</b>	CMI	1-64	8	16	8,1
	CMB	4-128	32	64	27,9
	CMI-B	4-256	32	128	34,8
	CMB-B	8-256	256	512	170,6
<b>Tobramicina</b>	CMI	1-32	8	16	4,6
	CMB	2-128	8	64	10,8
	CMI-B	0,5-256	8	128	9,3
	CMB-B	8-512	64	256	75,7
<b>Ciprofloxacino</b>	CMI	0,125-16	2	8	2,6
	CMB	0,5-32	8	32	7,6
	CMI-B	0,5-16	4	16	4,9
	CMB-B	1-256	32	128	30,9
<b>Levofloxacino</b>	CMI	0,25-32	8	16	6,0
	CMB	4-64	16	32	16,2
	CMI-B	1-32	8	16	6,8
	CMB-B	1-256	32	128	35,5
<b>Tetraciclina</b>	CMI	1-256	64	128	58,8
	CMB	64-512	128	256	139,2
	CMI-B	1->1024	256	512	111,8
	CMB-B	64-2048	1024	2048	879,4
<b>Colistina</b>	CMI	≤0,25-16	1	8	1,1
	CMB	0,5-8	1	8	1,4
	CMI-B	0,5-128	8	64	11,0
	CMB-B	4-256	32	64	30,4
<b>Azitromicina</b>	CMI	16-256	128	256	101,0
	CMB	256	256	256	256,0
	CMI-B	0,5-256	16	64	12,4
	CMB-B	16-512	256	512	264,8

## **2.6. Análisis estadístico de la actividad antimicrobiana convencional y en biopelículas en cepas de *P. aeruginosa* según la frecuencia de mutación y el morfotipo**

Se utilizó un análisis estadístico basado en el Test de Kruskal-Wallis para comparar todos los resultados, y se pudo concluir que no existen diferencias significativas entre los valores de CMI en biopelículas y en planctónico según su frecuencia de mutación.

Para analizar la posible relación entre la actividad de los antimicrobianos y el fenotipo mucoso o no mucoso se realizó un análisis con el Test de la U de Mann-Whitney, observándose una mayor resistencia para imipenem, tetraciclina, colistina y azitromicina en los aislados con morfotipo mucoso. No se detectó ninguna diferencia significativa.

## **3. Concentración que previene la aparición de mutantes resistentes**

Los resultados con la cepa control PAO1 al utilizar un inóculo obtenido en biopelículas demuestran que los valores de CMI para ceftazidima e imipenem, aumentan considerablemente, mientras que para ciprofloxacino y tobramicina los valores fueron prácticamente idénticos a los encontrados para PAO $\Delta$ mutS (Tabla 14).

En las cepas clínicas (n=42) se diferenciaron, al igual que en otros apartados, aquellas que presentaban un fenotipo hipermutador, normomutador e hipomutador si bien los valores de CMI de ciprofloxacino, tobramicina, ceftazidima e imipenem eran siempre más bajos en las cepas hipermutadoras, esta premisa se invirtió en el caso de los valores de CPM, donde las cepas hipermutadoras presentaban valores más elevados para todos los antibióticos (Tabla 15 y 16).



**Tabla 14.** Valores de CMI y CPM para las cepas control utilizando como inóculo crecimiento planctónico y en biofilm.

Antibiótico	Cepa	CMI		CPM	
		Planctónico	Biofilm	Plactónico	Biofilm
Ciprofloxacino					
	PAO1	0,25	0,25	8	4
	PAOΔ <i>mutS</i>	0,25	0,5	16	4
Tobramicina					
	PAO1	1	4	128	64
	PAOΔ <i>mutS</i>	4	16	128	64
Imipenem					
	PAO1	4	128	32	64
	PAOΔ <i>mutS</i>	4	128	32	64
Ceftazidima					
	PAO1	2	≥1024	32	≥1024
	PAOΔ <i>mutS</i>	8	≥1024	128	≥1024

CIP: Ciprofloxacino , TOB: Tobramicina ,IMP: Imipemen ; CAZ: Ceftazidima

Tabla 15. Distribución para cada antibiótico de los valores de CMI en µg/ml y de CPNI utilizando inóculos plaquéticos y en biopelícula.

Concentración (µg/ml)															CMI <sub>o</sub>	CMI <sub>o</sub>
0,25    0,5    1    2    4    8    16    32    64    128    256    512    1024																
Ciprofloxacino																
CMI	1	2	11	9	8	9	2							2	8	
CMI-B		1	3	9	8	10	11	12	1					4	16	
CPMI				2	6	9	12	12	1					16	32	
CPMI-B					15	10	9	7	1					8	32	
Tobramicina																
CMI			6	6	10	14	2	4						4	16	
CMI-B		2	1	4	10	8	7	2	4	2	2			8	64	
CPMI						4	13	8	13	4				32	64	
CPMI-B						5	5	12	8	11	1			32	128	
Imipenem																
CMI			1	10	5	11	7	5	3					8	32	
CMI-B					4	5	5	10	11	5	2			32	128	
CPMI							2	9	21	9	1			64	128	
CPMI-B								13	15	6	5	3		64	256	
Ceftriaxona																
CMI					4	10	10	8	2	4	1	3		16	128	
CMI-B				2	2	2	5	2	1	1	7	9	11	128	1024	
CPMI								1	2	4	4	9	22	1024	1024	
CPMI-B								3	3	8	5	17	6	512	1024	

**Tabla 16.** Valores de CMI y CPM para ciprofloxacino, tobramicina, imipenem y ceftazidima según la frecuencia de mutación de las cepas clínicas.

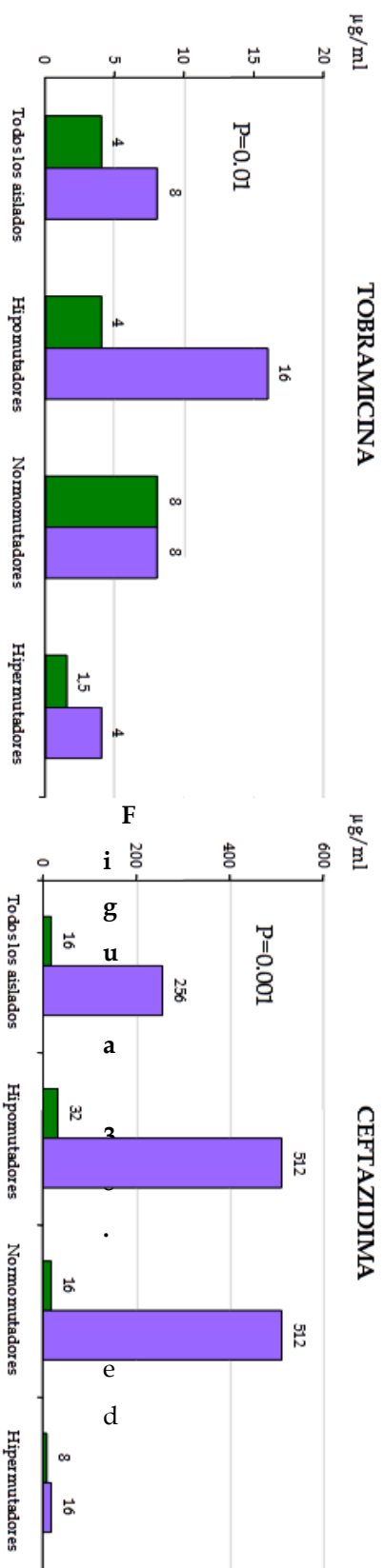
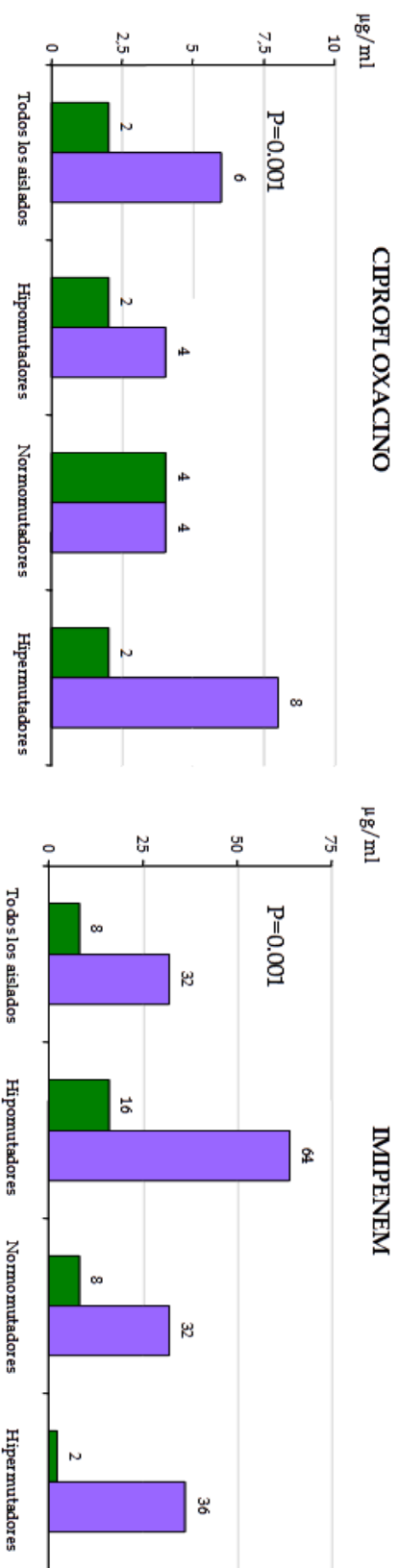
Fenotipo	Antibiótico	CMI (µg/ml)		CPM (µg/ml)	
		Rango	Media	Rango	Media
Normomutadoras					
	CIP	0,25-16	2,1	2-64	12,55
	TOB	1-32	4,7	8->64	29,27
	IMP	1-64	6,96	32-128	62,9
	CAZ	4-512	24,67	32->512	187,40
Hipermutadoras					
	CIP	0,5-8	1,53	4-32	16,92
	TOB	1-8	3,23	8-128	32
	IMP	1-64	4,69	16-128	49,02
	CAZ	8-512	18,77	64->512	210
Hipomutadoras					
	CIP	0,25-16	2,57	2-32	12,43
	TOB	2-32	5,3	8-128	27,49
	IMP	4-64	9,26	64-128	71,08
	CAZ	4-512	25,9	64->512	181.019

CIP: Ciprofloxacino , TOB: Tobramicina ,IMP: Imipemen ; CAZ: Ceftazidima

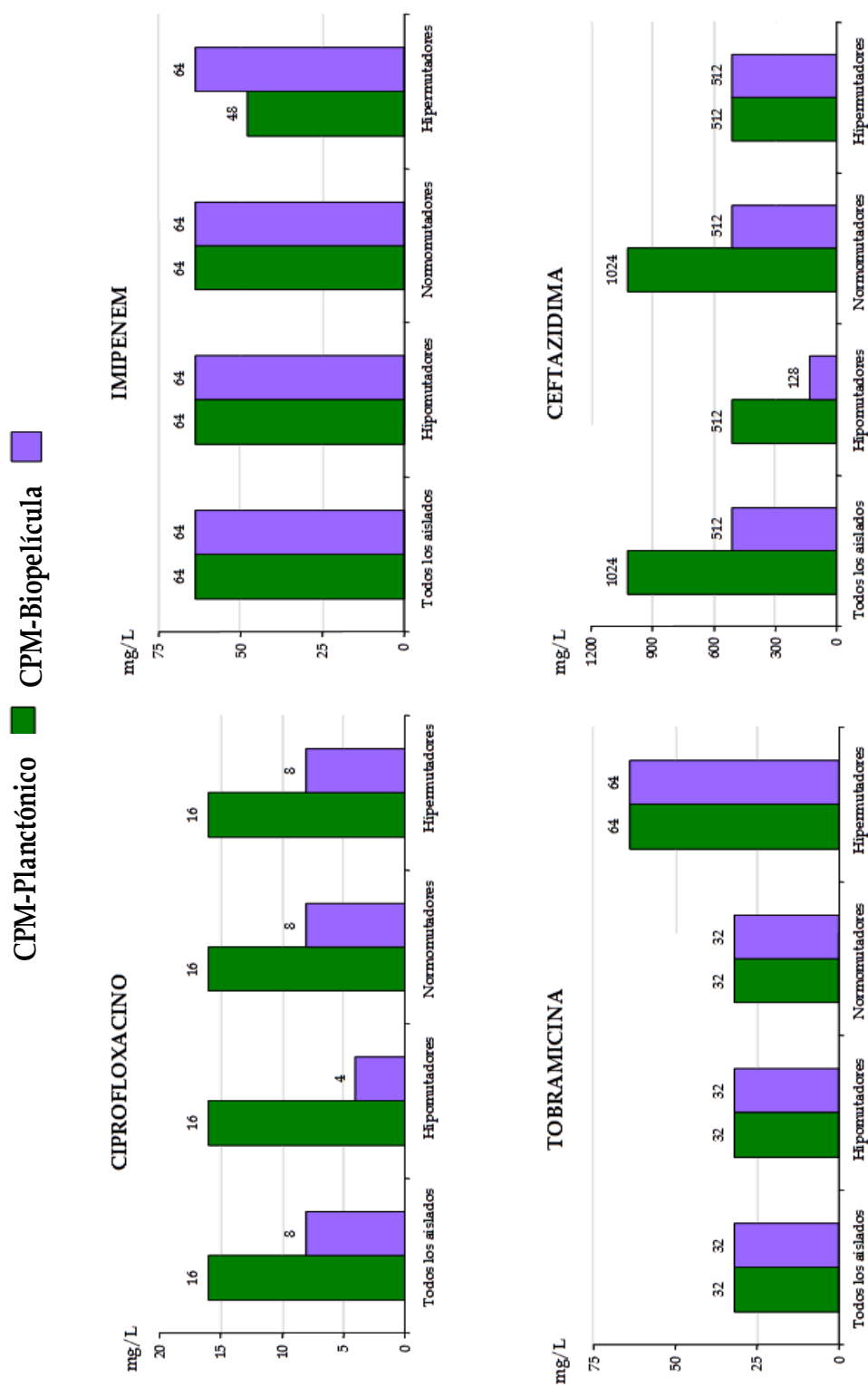
Los valores de CMI obtenidos para los antibióticos estudiados con los dos tipos de inóculos fueron significativamente diferente (Figura 37). Con esto nuevamente se constató que las cepas hipermutadoras eran más sensibles a los antibióticos que las normo o hipomutadoras.

Finalmente, no se detectaron diferencias significativas en los valores de CPMs cuando el inóculo se realizó en biopelícula respecto al inóculo planctónico. Asimismo, tampoco se encontraron diferencias significativas en la CPMs según la frecuencia de mutación de las cepas (Figura 38).

CMI-Plañtónico ■ CMI-Biopelícula ■



**Figura 37.** Media geométrica de los valores de CMI en µg/ml para cada antibiótico, según la frecuencia de mutación de las cepas y el inóculo, en biopelícula o en planctónico.



**Figura 38.** Media de los valores de CPM en µg/ml para cada antibiótico, según la frecuencia de mutación de las cepas y el inóculo en biopelícula o en planctónico.

#### 4. Caracterización de mecanismos de resistencia en los mutantes obtenidos en concentraciones sub-CPM en cepas control (PAO y PAO1ΔmutS)

Para todos los antibióticos, se obtuvo un mayor número de mutantes resistentes a partir de la cepa hipermutadora PAO1ΔmutS (n=20) en comparación con su variante normomutadora PAO (n=10). A su vez, los mutantes seleccionados a partir de la cepa hipermutadora presentaron valores de CMI muy superiores a los iniciales, y también ligeramente superiores a los de los mutantes de su variante normomutadora (Tabla 17).

**Tabla 17.** Valores de CMI de diferentes antimicrobianos frente a las cepas originales y los correspondientes mutantes seleccionados.

Cepas	Ciprofloxacino	Imipenem	Ceftazidima	Tobramicina
PAO	0,12	4	1	0,5
Mutantes-PAO1	0,5-4	8	32	4
PAO1ΔmutS	0,12	4	8	2
Mutantes-PAO1ΔmutS	4-32	16	128-256	16

En los 17 mutantes seleccionados, 5 de ellos en PAO1 y los otros 12 en PAO1ΔmutS en las placas con ciprofloxacino de 1 ó de 2 µg/ml, se analizaron las mutaciones en los fragmentos de las regiones que incluyen el QRDR (*quinolone resistance determining region*) de los genes de la topoisomerasa II (*gyrA* y *gyrB*) y de las topoisomerasa IV (*parE* y *parC*). Para ello, se amplificaron cada uno de los genes mediante PCR con cebadores específicos. Los amplicones se purificaron y posteriormente se secuenciaron ambas hebras.

Los resultados mostraron que en los 17 mutantes sólo se detectó una mutación Phe→Ser en la región QRDR del gen *gyrB*, mientras que en la región QRDR del gen *gyrA* se detectaron las mutaciones en Thr<sub>83</sub>Ile y Asp<sub>87</sub>Asn en 3 y

4 mutantes, respectivamente. No se encontró ninguna mutación en el gen *parE* ni en el gen *parC* (Tabla 18).

En las placas de selección con beta-lactámicos se seleccionaron 11 mutantes: 5 en ceftazidima (2 a partir de PAO1 y 3 de PAO1 $\Delta$ *mutS*) y 6 en imipenem (2 a partir de PAO1 y 4 de PAO1 $\Delta$ *mutS*). En estos mutantes se estudiaron los posibles mecanismos de resistencia asociados como la hiperexpresión y sistemas de expulsión mediados por bombas.

En los 3 mutantes obtenidos a partir de la cepa hipermutadora PAO1 $\Delta$ *mutS* con selección en ceftazidima, 2 tenían una elevada actividad enzimática compatible con una hiperproducción de AmpC y la tercera, además de presentar una elevada actividad enzimática, también se demostró la hiperexpresión de la bomba de expulsión MexAB. La sobreexpresión de las bombas MexCD y MexXY fue negativa en todos los mutantes obtenidos a partir de imipenem o ceftazidima, mientras que la sobreexpresión de OprD fue débilmente positiva en seis de ellos. El mutante PAO1 $\Delta$ *mutS*-65 no presentó ninguna alteración de los mecanismos explorados.

En los mutantes de PAO1 (n=2) seleccionados con imipenem se demostró que, uno presentaba una mutación simple en OprD y el otro una mutación doble en MexAB y OprD. De los 4 mutantes derivados de PAO1 $\Delta$ *mutS* 3 tuvieron sobreexpresión en dos bombas diferentes, una en Mex AB y en OprD, y el otro solo una en OprD.

En los mutantes seleccionados en placas con tobramicina se demostró la hiperexpresión de los sistemas MexAB y MexXY en el único mutante obtenido a partir de la cepa PAO1, mientras que en el derivado de PAO1 $\Delta$ *mutS* se evidenció la hiperexpresión simultánea de los sistemas MexAB, MexCD y MexXY (Tabla 19 y 20).

**Tabla 18.** Mecanismos de resistencia de los diferentes mutantes con resistencia a ciprofloxacino.

Mutante	Placa de selección	CMI CIP	<i>gyrB</i>	<i>gyrA</i>	<i>parE</i>	<i>parC</i>	<i>mexAB</i>	<i>mexCD</i>	<i>mexXY</i>	<i>oprD</i>	Actividad Enzimática
PAOI-19	CIP 1	4	-	-	-	-	+	+	-	+	
PAOI-39	CIP 2	4	-	T831	-	-	-	-	-	+	
PAOI-47	CIP 1	0,5	-	-	-	-	+	-	-	+/-	
PAOI-48	CIP 2	2	-	-	-	-	-	-	-	+	
PAOI-50	CIP 1	4	-	-	-	-	+	-	-	+/-	
PAOIΔ <i>muts</i> -21	CIP 2	8	-	T831	-	-	+	-	-	-	
PAOIΔ <i>muts</i> -29	CIP 2	16	-	T831	-	-	-	-	-	-	
PAOIΔ <i>muts</i> -37	CIP 1	16	-	Asp87Asn	-	-	-	-	-	-	
PAOIΔ <i>muts</i> -42	CIP 1	4	-	-	-	-	-	-	-	-	
PAOIΔ <i>muts</i> -44	CIP 2	4	-	-	-	-	-	-	-	-	
PAOIΔ <i>muts</i> -49	CIP 1	4	-	-	-	-	-	-	-	-	
PAOIΔ <i>muts</i> -51	CIP 1	32	-	Asp87Asn	-	-	+	+	-	+	0,00007
PAOIΔ <i>muts</i> -52	CIP 1	16	-	Asp87Asn	-	-	+	-	-	-	
PAOIΔ <i>muts</i> -73	CIP 1	8	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0003
PAOIΔ <i>muts</i> -74	CIP 1	32	-	-	-	-	+	-	-	-	0,0011
PAOIΔ <i>muts</i> -75	CIP 1	8	F-S	-	-	-	+	-	-	-	0,0005
PAOIΔ <i>muts</i> -76	CIP 1	8	-	Asp87Asn	-	-	-	-	-	-	0,0012



**Tabla 19.** Mecanismos de resistencia de los diferentes mutantes con resistencia a tobramicina.

Mutante	Placa de selección	CMI TOB	<i>gyrB</i>	<i>gyrA</i>	<i>parE</i>	<i>parC</i>	<i>mexAB</i>	<i>mexCD</i>	<i>mexXY</i>	<i>oprD</i>	Actividad Enzimática
PAO1-57	TOB 4	4					+	-	+		
PAO1Δ <i>mutS</i> -45	TOB 16	16					+	+	+		

**Tabla 20.** Mecanismos de resistencia de los diferentes mutantes con resistencia a imipenem y ceftazidima.

Mutante	Placa de selección	CMI CAZ	CMI IMI	<i>gyrB</i>	<i>gyrA</i>	<i>parE</i>	<i>parC</i>	<i>mexAB</i>	<i>mexCD</i>	<i>mexXY</i>	<i>oprD</i>	Actividad Enzimática
PAO1-25	CAZ 32	32	4					-	-	-	+/-	0,086
PAO1-58	CAZ 32	32	4					-	-	-	+/-	0,001
PAO1-70	IMI 8	1	32					-	-	-	+/-	0,0006
PAO1-71	IMI 8	1	4					+	-	-	+/-	0,0009
PAO1Δ <i>mutS</i> -80	CAZ 128	128	4					-	-	-	+/-	3,4
PAO1Δ <i>mutS</i> -79	CAZ 128	256	4					-	-	-	+/-	1,29
PAO1Δ <i>mutS</i> -17	CAZ 128	128	4					+	-	-	-	2,5
PAO1Δ <i>mutS</i> -63	IMI 16	16	32					+	-	-	-	0,003
PAO1Δ <i>mutS</i> -65	IMI 16	16	32					-	-	-	-	0,00008
PAO1Δ <i>mutS</i> -33	IMI 16	4	32					+	-	-	-	0,00009
PAO1Δ <i>mutS</i> -64	IMI 16	32	32					+	-	-	-	0,0004

### 5. Dinámica de crecimiento de *P. aeruginosa*

Los resultados de estas curvas de crecimiento realizadas en condiciones óptimas de nutrientes y de temperatura mostraron que en igualdad de condiciones, la cepa PAO1 $\Delta$ mutS crece más lentamente y alcanza una menor DO que su isogénica PAO1 en el mismo tiempo (Figura 39). En la pareja de cepas clínicas no se encontraron diferencias importantes, denotando posibles mutaciones adaptativas compensatorias.

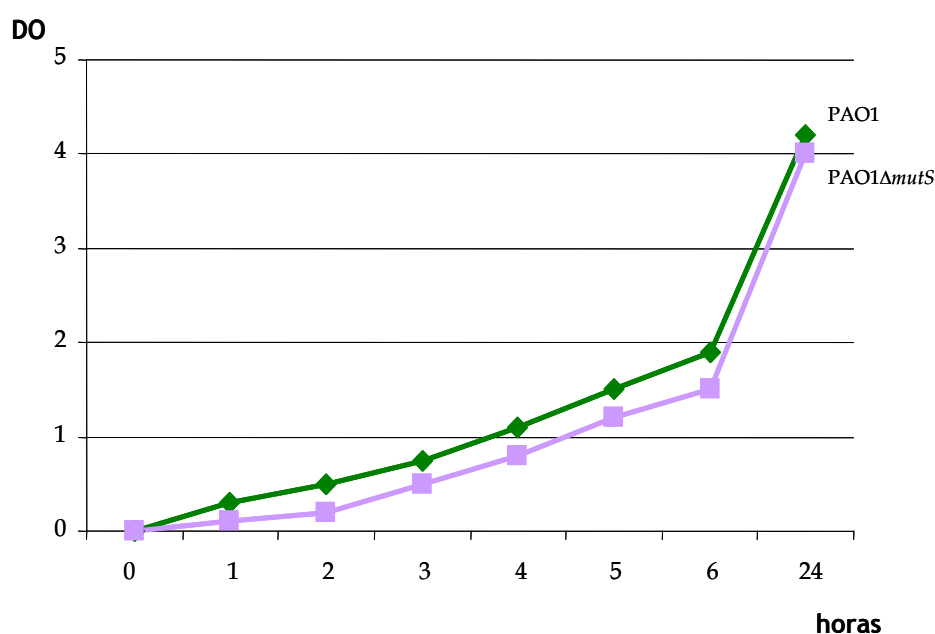


Figura 39. Curva de crecimiento PAO1 y PAO1 $\Delta$ mutS.

Para los ensayos de competición entre los aislados clínicos normo e hipermutadores, se necesitó disponer de un marcador estable y a la vez selectivo que permitiese la diferenciación entre ambas cepas. Con este fin, en todos ellos se introdujo, mediante transformación, el plásmido pSMC2 que contiene un marcador de resistencia a ticarcilina.

Para comprobar si este plásmido producía un retraso en el crecimiento de la cepa que lo portaba, se obtuvieron todas las combinaciones posibles de las parejas de cepas con y sin el plásmido. Cuya presencia demostró no tener influencia en el crecimiento de las cepas.

Otro de los factores que pueden influenciar la velocidad de crecimiento bacteriano es la disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo. Para analizar si este factor podía influenciar, realizamos curvas de crecimiento durante 6 días con filtros de nitrocelulosa en placas de medio mínimo M63 con tres variantes: Medio M63, M63 suplementado con alginato (utilizado como “fijador” de cepas bacterianas) y M63 suplementado con dipiridilo (agente quelante de Fe. (Figura 40).

En todos los casos ensayados se observó que en los medios pobres en nutrientes como M63 y M63+dipiridilo, las cepas normomutadoras PAO1 y JM105 alcanzaba mayor densidad de crecimiento que las hipermutadoras PAO1mutS y JM7 $\Delta$ mutS. En el medio más rico en nutrientes, M63+alginato, ambas variantes alcanzan niveles similares.

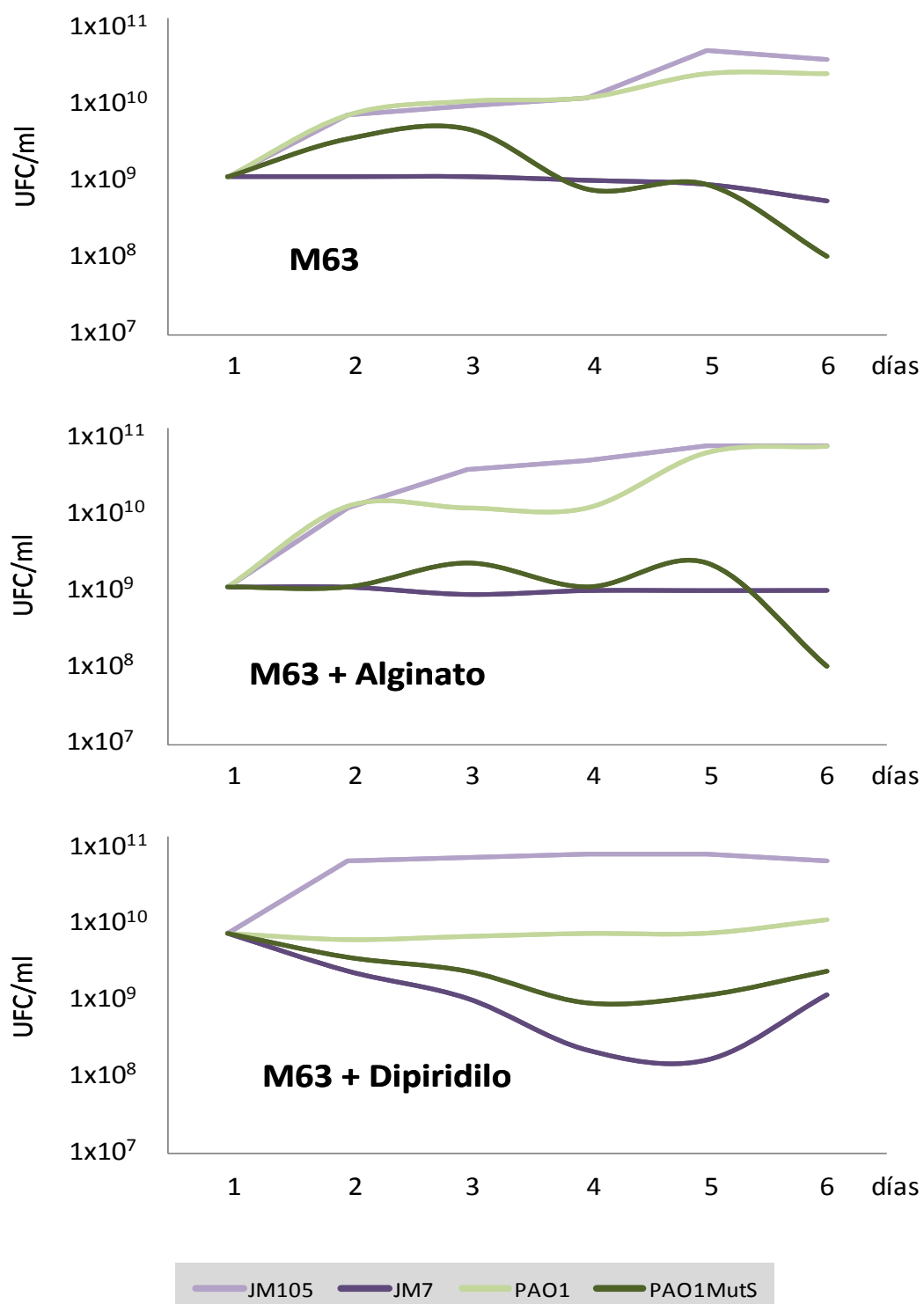


Figura 40. Curvas de crecimiento de las parejas isogénicas en filtros de nitrocelulosa en diferentes medios de cultivo durante seis días de incubación.

### 5.1. Crecimiento en competición en filtros de nitrocelulosa sin antimicrobiano

Una vez comprobado el patrón de crecimiento de cada cepa por separado, se establecieron diferentes proporciones de cada una de ellas para realizar los experimentos de competición, proporción 50/50 con un inóculo ajustado a una DO de 0,6 que se corresponde a  $5 \times 10^6$  UFC. Cada ensayo se realizó en placas con los diferentes medios de cultivo ensayados.

Los resultados obtenidos a las 24h mostraron un incremento de la proporción de la cepa normomutadora (PAO1) en los tres medios de cultivo ensayados (Figura 41). Al igual que ocurría en los ensayos por separado, esta ventaja fue más notable en los medios pobres M63 y M63+dipiridilo que en el medio rico en nutrientes que contiene alginato. A los 7 días del co-cultivo, la población de la cepa hipermutadora PAO1 $\Delta$ mutS disminuyó por debajo del 15%.

Al repetir el ensayo anterior con las cepas clínicas, los resultados fueron similares a los anteriores, siendo la proporción final de la cepa normomutadora JM105 mucho más alta que el de la cepa hipermutadora JM7 $\Delta$ mutS. No obstante, en este caso la disminución no fue tan manifiesta como con las cepas PAO y PAO $\Delta$ mutS anterior. En la pareja de cepas clínicas se observa que a partir de las 96h comienza a producirse un discreto recrecimiento de la cepa hipermutadora JM7 $\Delta$ mutS, pudiendo denotar una mejor adaptabilidad que las cepas controles.

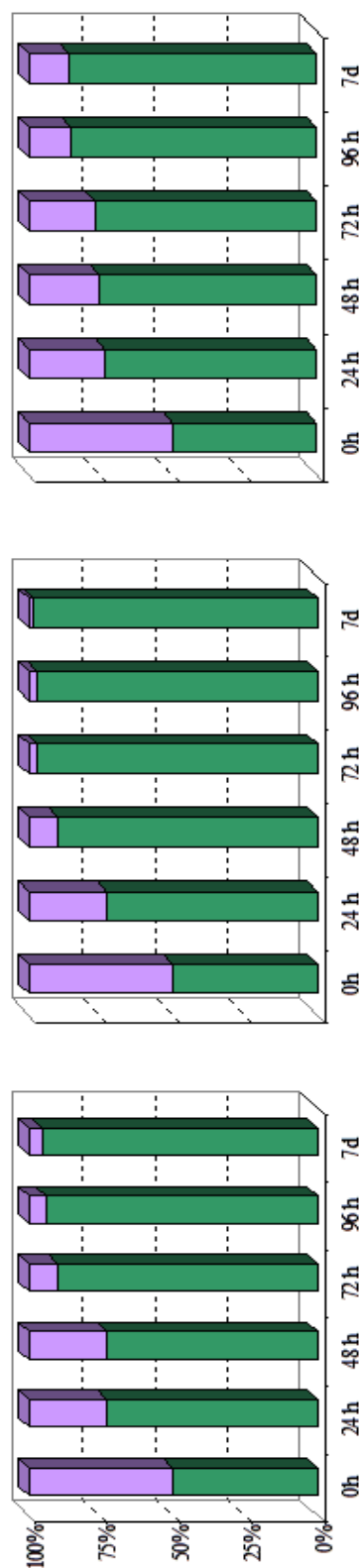
En la Figura 42 se muestran los resultados obtenidos en la proporción 10/90, observándose el mismo fenómeno de desventaja de la cepa hipermutadora. Cuando se inoculó en una proporción de 1/99 (Figura 43) nuevamente la cepa PAO1 desplazó a su isogénica PAO $\Delta$ mutS, aunque no fue capaz de eliminarla completamente.

Las mismas proporciones se ensayaron con las cepas clínicas JM7 $\Delta$ mutS y JM105 obteniendo unos resultados muy similares a las de las proporciones 50/50. La cepa normomutadora JM105 tiene una mayor ventaja, aún estando en proporciones mucho menores que la mutadora JM7 $\Delta$ mutS.

Para explorar todas las posibilidades de ventaja/desventaja, se repitieron todos los experimentos anteriores nuevamente pero en esta ocasión, el plásmido pSMC2-

TIC<sup>R</sup>se introdujo en la cepa normomutadora en lugar de la hipermutadora. Los resultados obtenidos fueron similares para todas las proporciones y condiciones de medios de cultivo (datos no mostrados). Estos resultados permitieron considerar que la presencia del plásmido no interfería en el crecimiento de la bacteria, y que las cepas normomutadoras tienen definitivamente más ventaja que las hipermutadoras cuando se exponen en competición en ausencia de antimicrobianos.

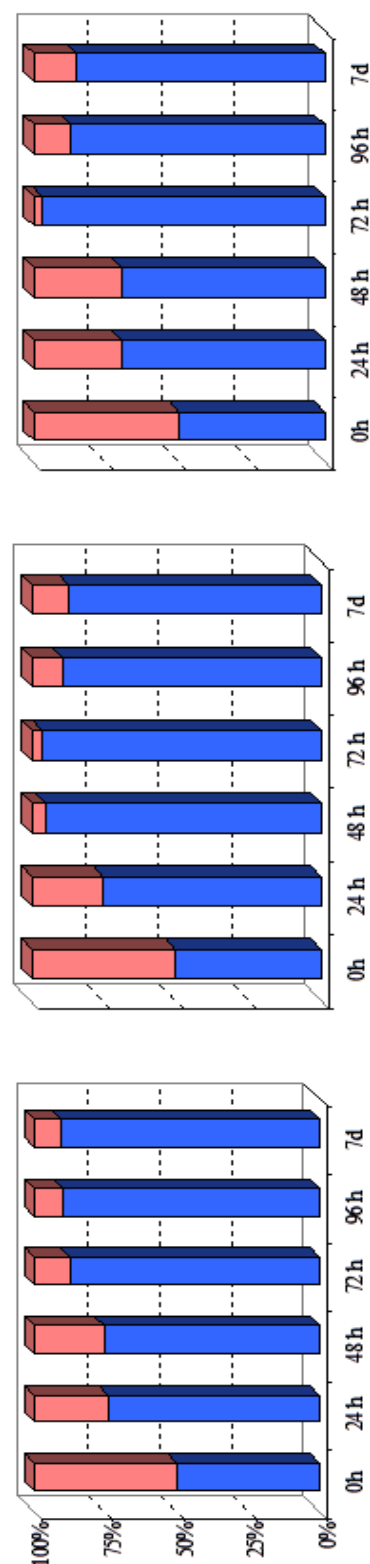
# PAO1 vs PAO1ΔmutS



## M63

## M63 + dipiridilo

## M63 + alginato



# JM105 vs JM7ΔmutS

Figura 41. Competición de cepas normo e hipermutadoras en la misma proporción (50/50).

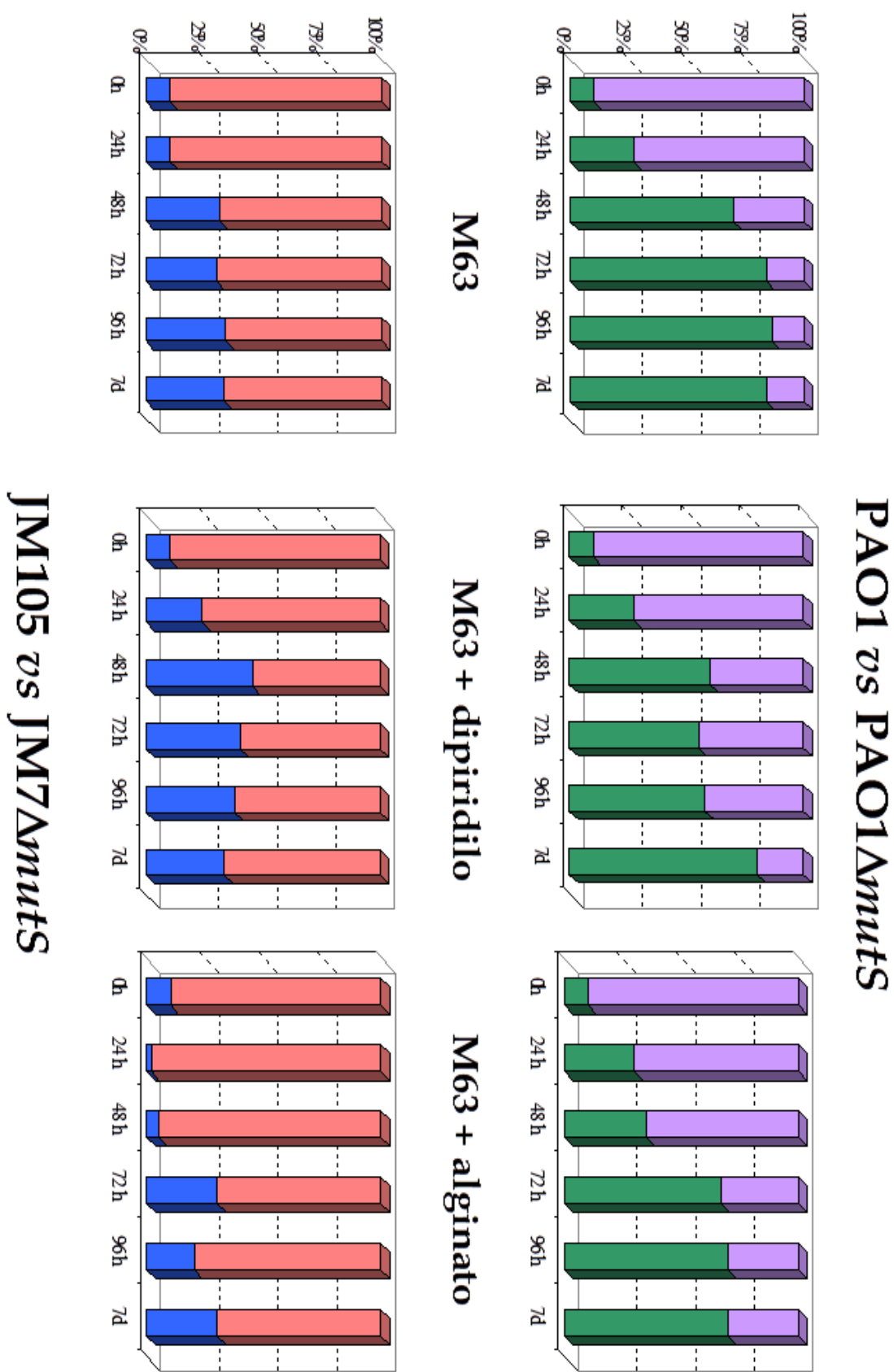
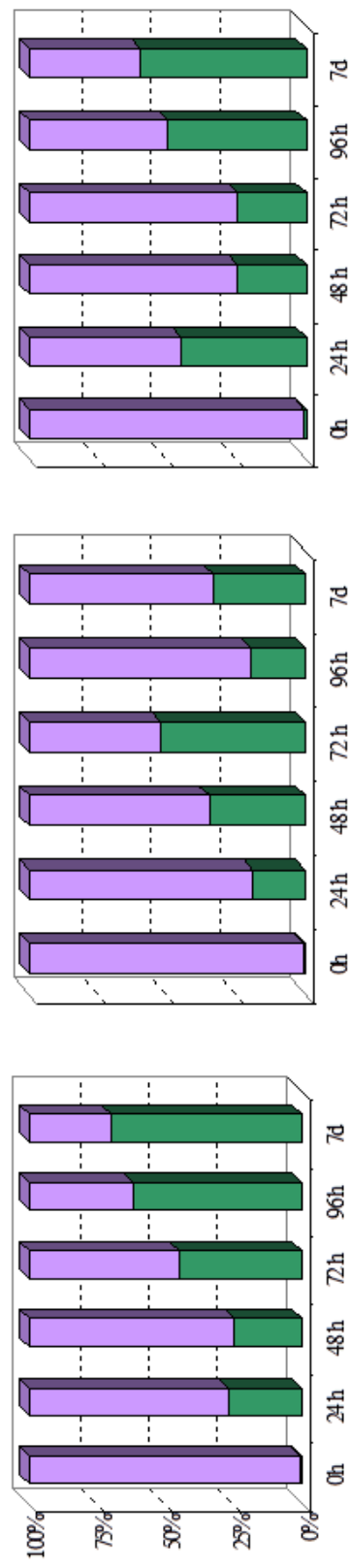


Figura 42. Competición de cepas normo e hipermutadoras con la proporción 10/90.



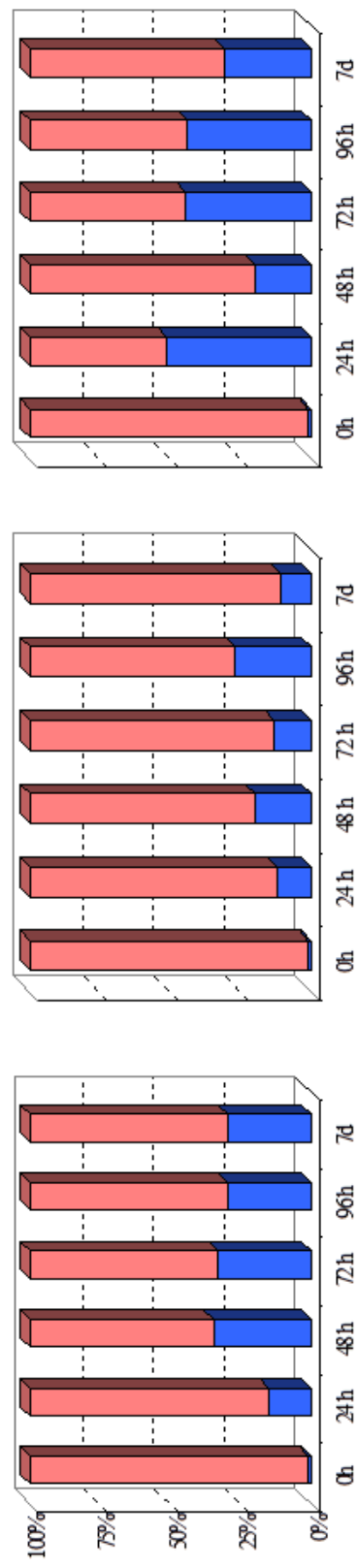
PAO1 vs PAO1ΔmutS



M63

M63 + dipiridilo

M63 + alginato



JM105 vs JM7ΔmutS

Figura 43. Competición de cepas normo e hipermutadoras en la proporción 1/99.

## 5.2. Ensayos de crecimiento sin competición en filtros de nitrocelulosa en presencia de antimicrobianos

Con posterioridad, se introdujo la presencia de antibiótico como variable para analizar la ventaja o desventaja de las cepas normomutadoras sobre las hipermutadoras. Se repitieron los ensayos anteriores de forma similar pero utilizando solamente medio de cultivo M63 suplementado con ciprofloxacino en diferentes concentraciones.

Los resultados mostraron que el crecimiento de una cepa en presencia de antibiótico, si esta se trata de una hipermutadora, sobre todo JM7 $\Delta$ mutS y en menor medida PAO $\Delta$ mutS, es capaz de crecer a concentraciones de antibiótico más elevadas que sus isogénicas normomutadoras (Figura 44).

Una variante que se estudió fue crecer el microorganismo en un filtro de nitrocelulosa sin antibiótico durante 48 hora, pasado este tiempo se inoculó en placas con diferentes concentraciones de antibiótico, nuevamente las variantes hipermutadoras fueron capaces de crecer a concentraciones mas altas de antimicrobiano que las normomutadoras (Figura 45).

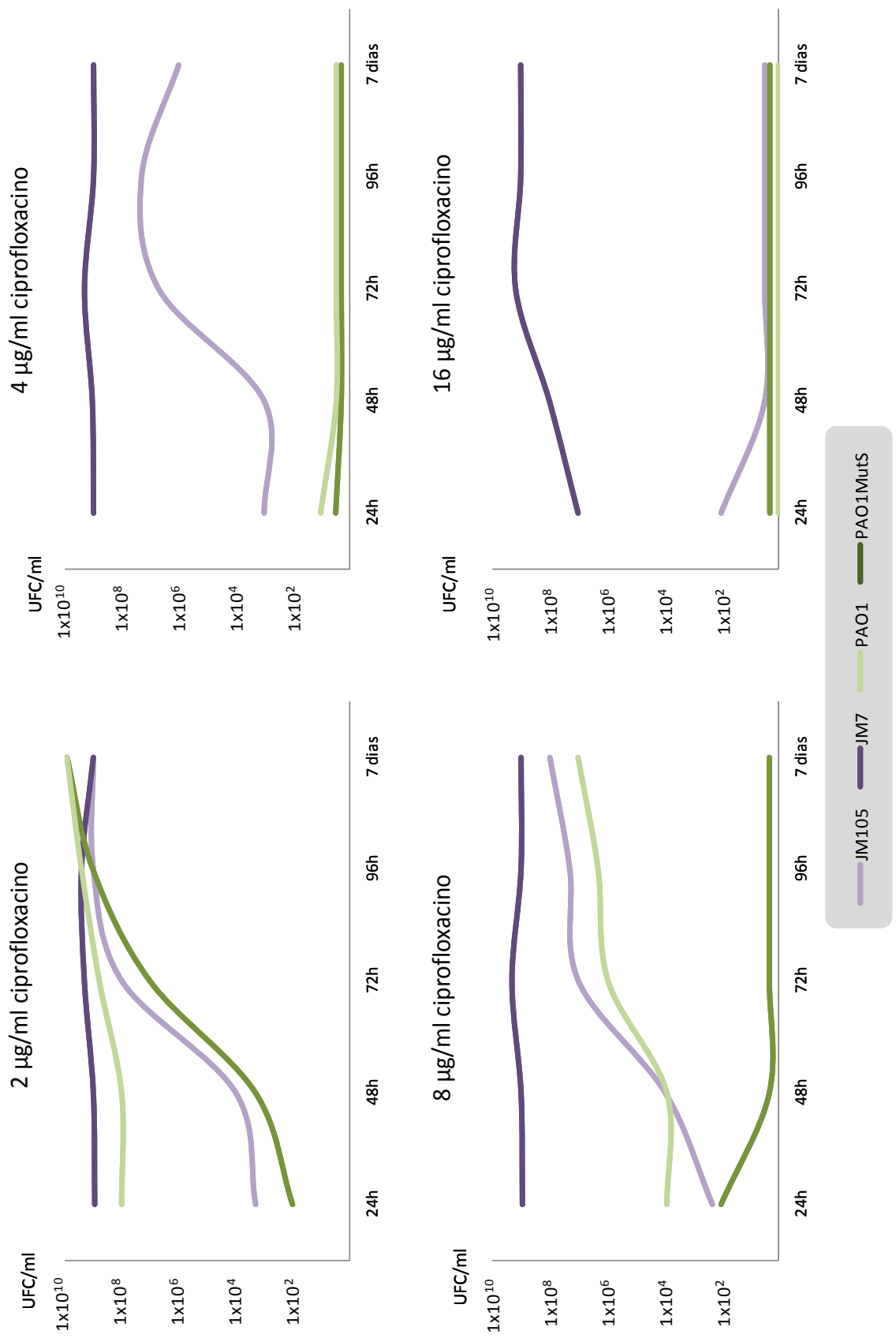


Figura 44. Recuentos bacterianos en cultivos individuales sobre filtros de nitrocelulosa en M63 agar con ciprofloxacino.

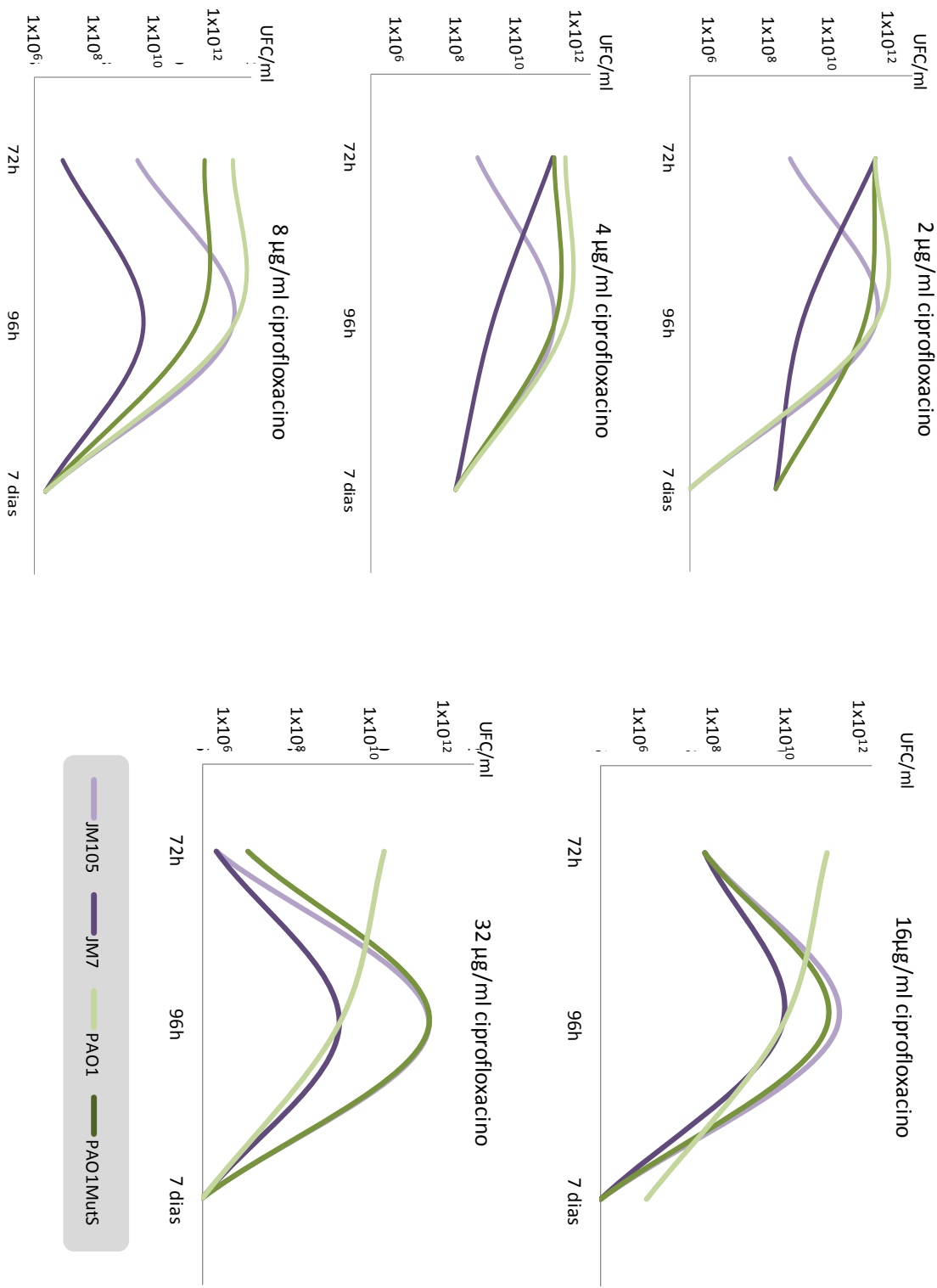
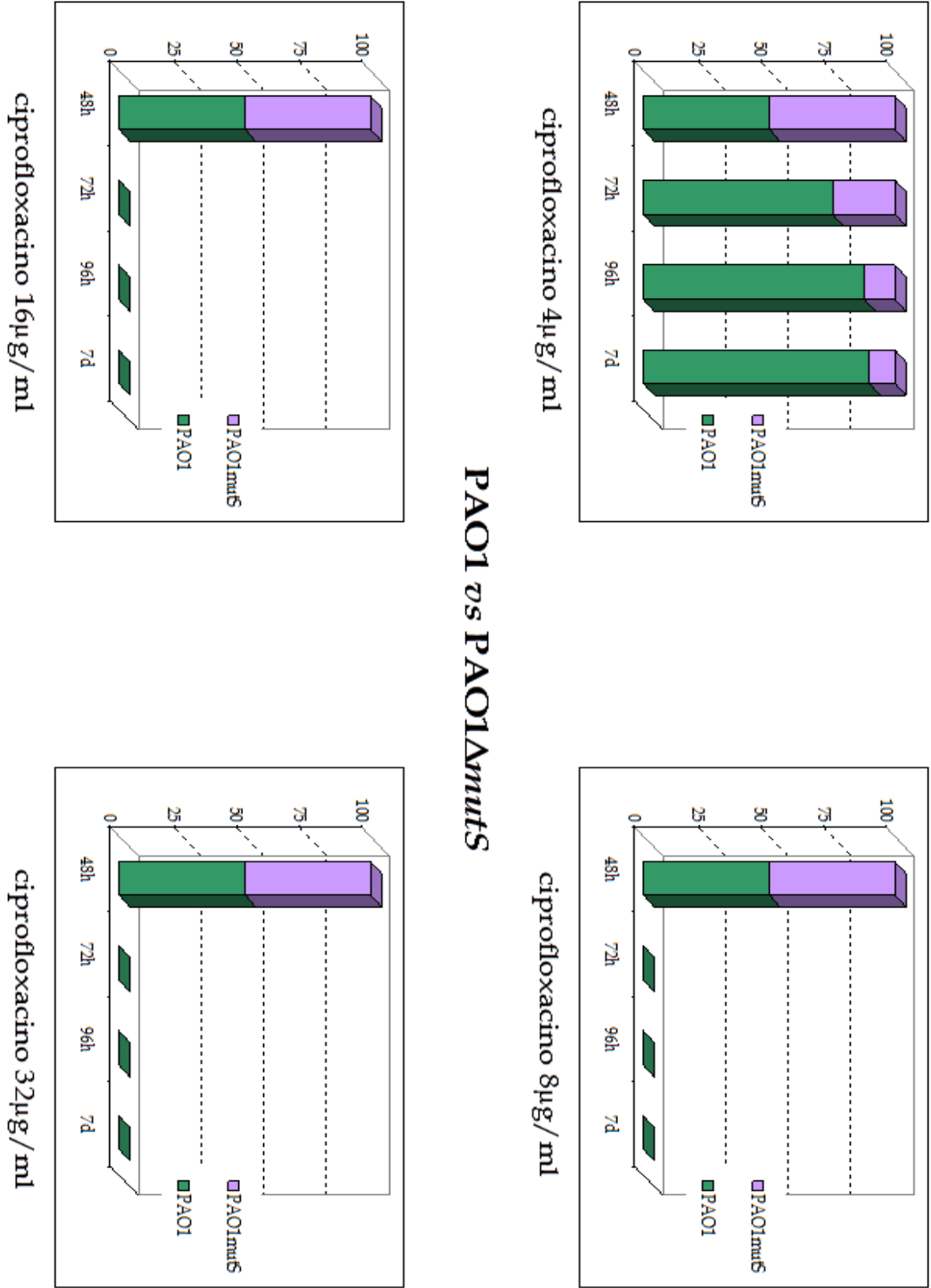


Figura 45. Recuento de las cepas crecidas en filtro con diferentes concentraciones de ciprofloxacino.

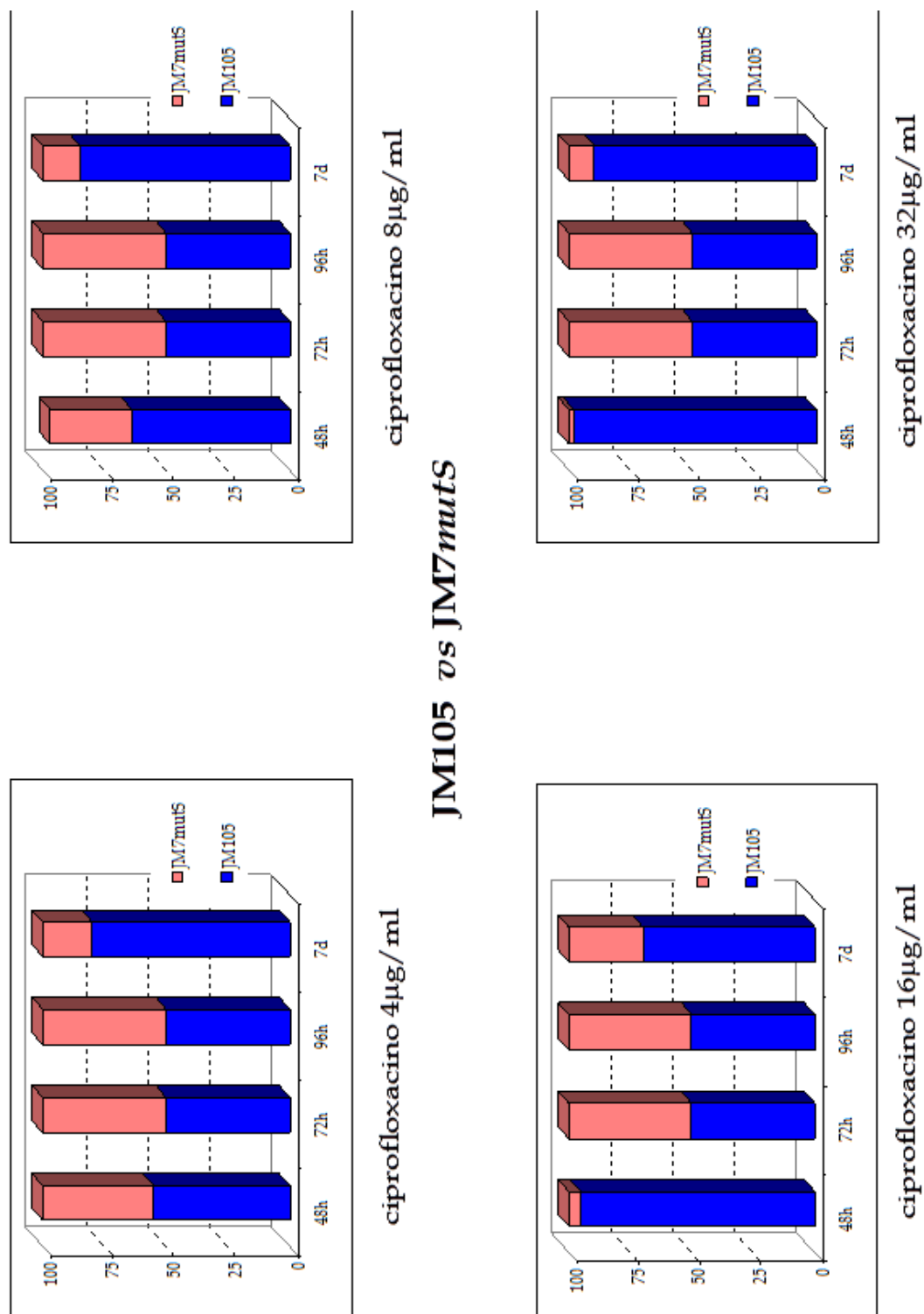
### 5.3. Ensayos de competición en filtro de nitrocelulosa en presencia de antimicrobianos

Nuevamente, tras conocer el comportamiento de las cepas por separado en presencia de antibiótico, se realizaron los experimentos de competición en presencia de antibiótico reuniendo en un mismo cultivo las diferentes parejas isogénicas. En primer lugar las cepas PAO1 y PAO1 $\Delta$ *mutS* en una proporción 50/50 en filtros sin antibiótico durante 24 horas, tras los cuales se realizó un recuento de cada cepa. Los resultados mostraron una ventaja de PAO1, que se recuperó en una proporción del 82%, sobre su isogénica PAO1 $\Delta$ *mutS* 18%. Posteriormente, se repitió el mismo experimento, pero a las 24 horas se depositaron los filtros en placas con ciprofloxacino (rango de 4 a 32  $\mu$ g/ml). Los recuentos mostraron que a concentraciones altas de antibiótico no se detectaron ninguna de las dos cepas (Figura 46). En las placas de ciprofloxacino 4  $\mu$ g/ml, la cepa normomutadora desplaza a la hipermutadora sin llegar a eliminarla del todo.

Todos los experimentos se repitieron con la pareja JM105 y JM7 $\Delta$ *mutS*. En primer lugar se inocularon en la proporción 50:50 en los filtros durante 24 horas sin antibiótico. Tras la incubación los recuentos mostraron una ventaja de la cepa JM105 (61%) frente a su isogénica JM7 $\Delta$ *mutS* (38%) (Figura 47).



**Figura 46.** Proporciones de las cepas PAO1/PAO1mutS en competición en presencia de antibiótico desde las 48 horas (partiendo de un unóculo 50/50).



**Figura 47.** Proporciones de las cepas JM105/JM7Δ*mutS* en competición en presencia de antibiótico desde las 48 horas (partiendo de un inóculo 50/50)

Posteriormente dispusieron cada una de las parejas de cepas en proporción 50:50 a un co-cultivo en presencia del antibiótico desde el primer momento. En la pareja PAO1/PAO1 $\Delta$ *mutS* (Figura 48) se pudo observar que en los primeros días de incubación y en concentraciones bajas de antibiótico hay diferencias entre las dos variantes; pero esta diferencia se anula al final de los 7 días del experimento. En las placas que tenían concentraciones más altas de antibiótico, la variante normomutadora finalmente desplaza a PAO1 $\Delta$ *mutS*.

En la Figura 49 se reflejan los datos obtenidos para la pareja de cepas clínicas (JM 7 y JM 105) después de estar en presencia de antibiótico durante 7 días en una proporción inicial del 50%. En este caso la cepa normomutadora no desplaza a la hipermutadora, llegando a crecer en una concentración de 32  $\mu$ g/ml de ciprofloxacino.



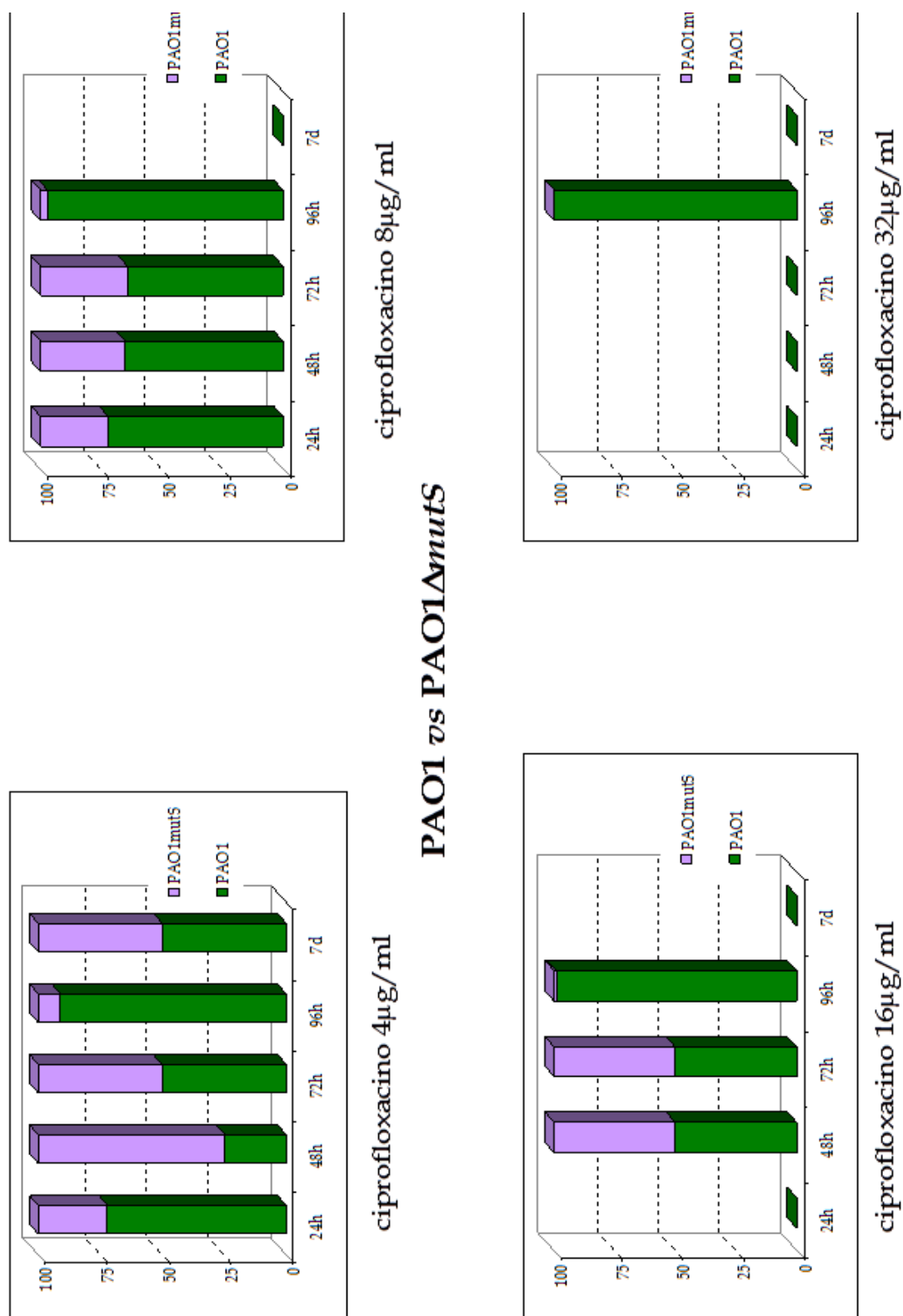


Figura 48. PAO1/PAO1ΔmutS juntas en competición desde el primer día en presencia de antibiótico

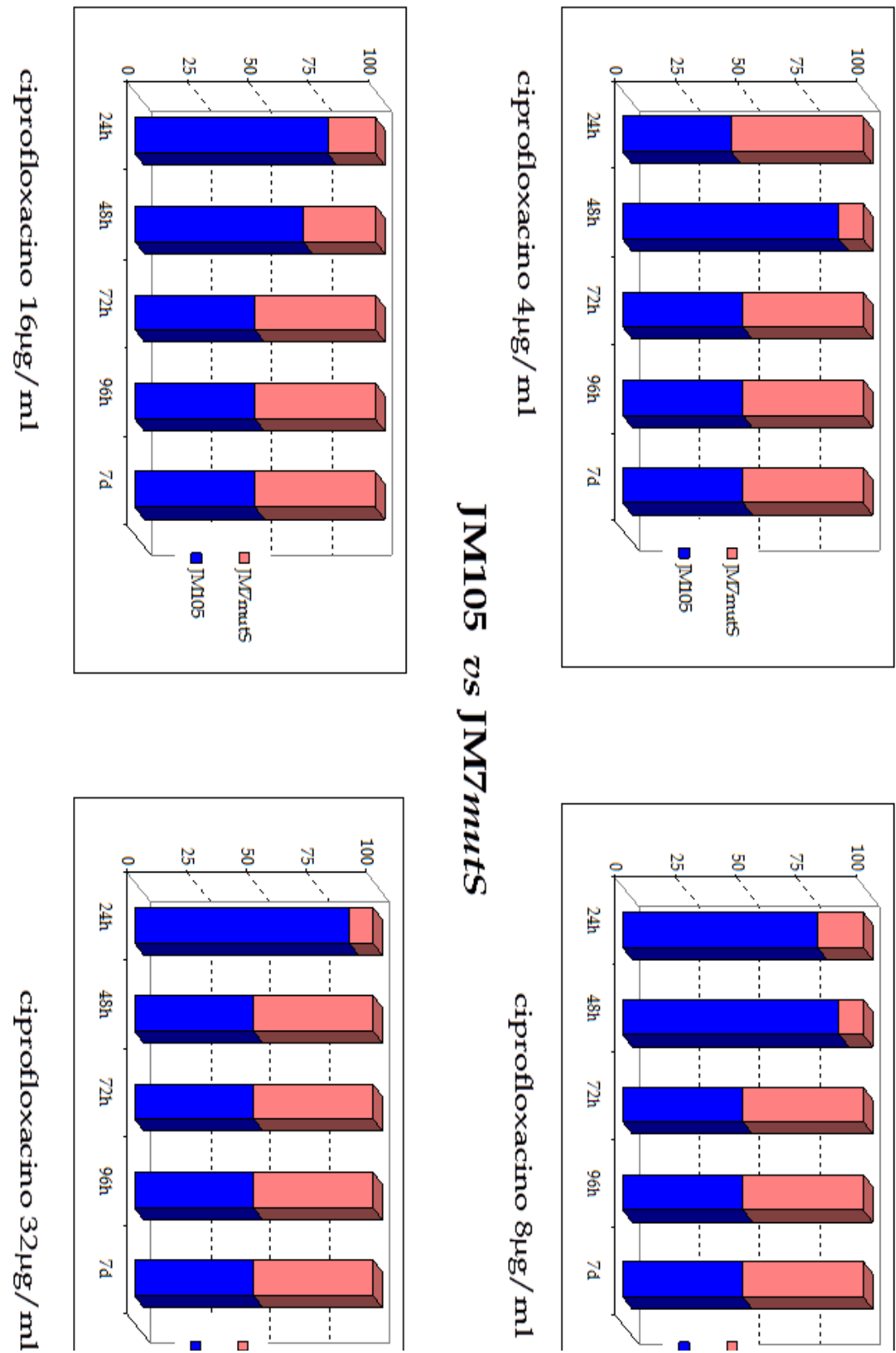
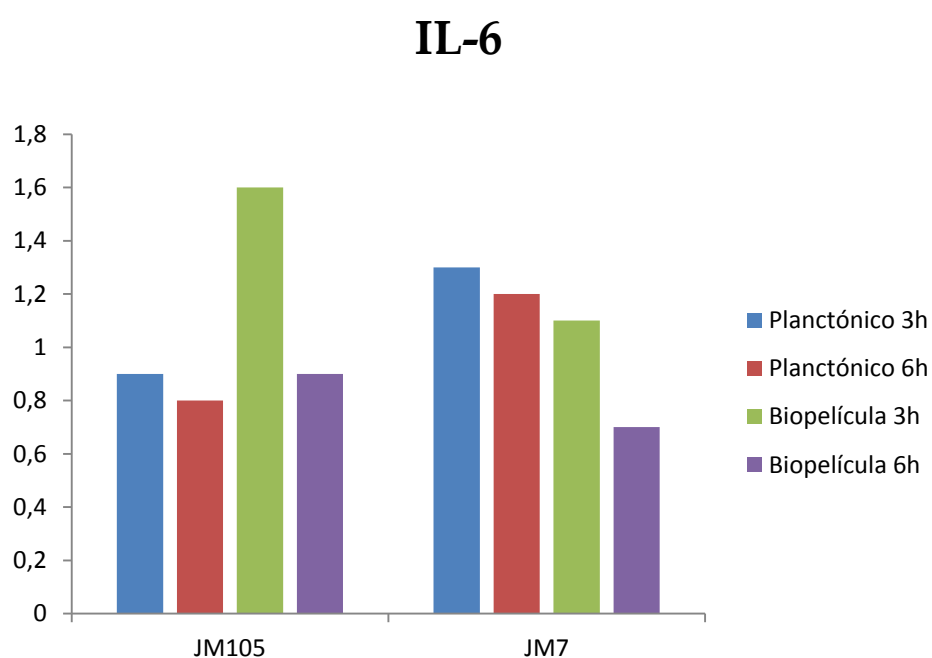


Figura 49. JM7 (mutadora) y JM105 juntas en competición desde el primer día en presencia de antibiótico.

### **6. Respuesta del sistema inmune innato frente a *P. aeruginosa***

Para conocer las posibles diferencias en la respuesta del sistema inmune innato frente a *P. aeruginosa* con diferente frecuencia de mutación se enfrentaron dos aislados isogénicos de *P. aeruginosa* (JM7 y JM105) a la fracción celular de monocitos/macrófagos de dos voluntarios sanos donantes de sangre, midiendo diferentes marcadores de la inflamación. En primer lugar se analizaron los resultados obtenidos en la expresión de IL-6 (Figura 50).

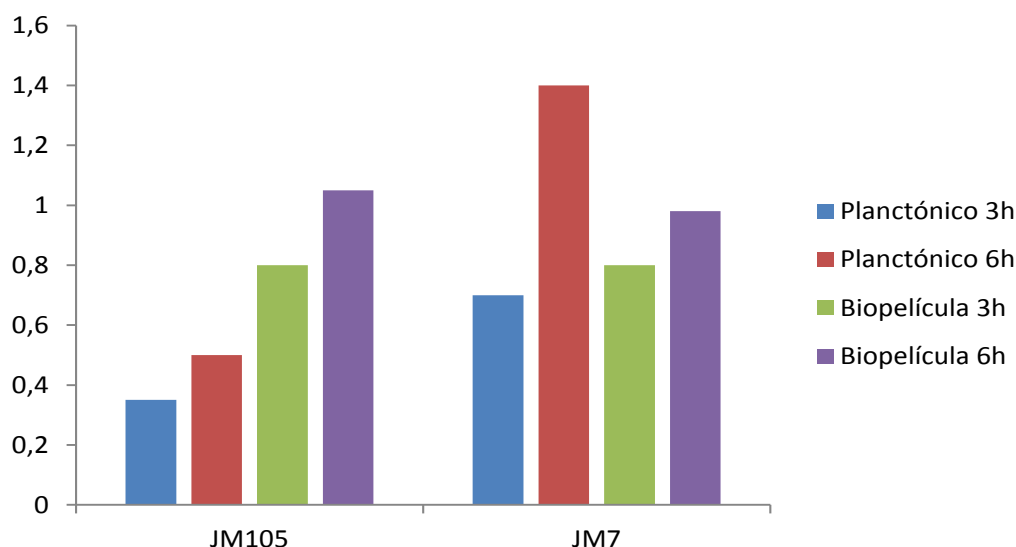


**Figura 50.** Niveles de expresión de IL-6 en monocitos/macrófagos obtenidos de voluntarios sanos tras 3 y 6 horas de exposición.

Los resultados muestran que la expresión de IL-6 es homogénea en todos los puntos del ensayo, siendo mayor la respuesta a las 3 horas que a las 6 horas sobre todo en crecimiento en biopelícula con la cepa normomutadora.

En el caso de IL-10 también se comprobó una expresión homogénea en todos los puntos, pero que en este caso aumentase con el tiempo de exposición. Se puede intuir una mayor expresión de IL-10 en la cepa hipermutadora JM7, especialmente cuando comparamos los inóculos de tipo planctónico con los de la cepa normomutadora (Figura 51).

### IL-10

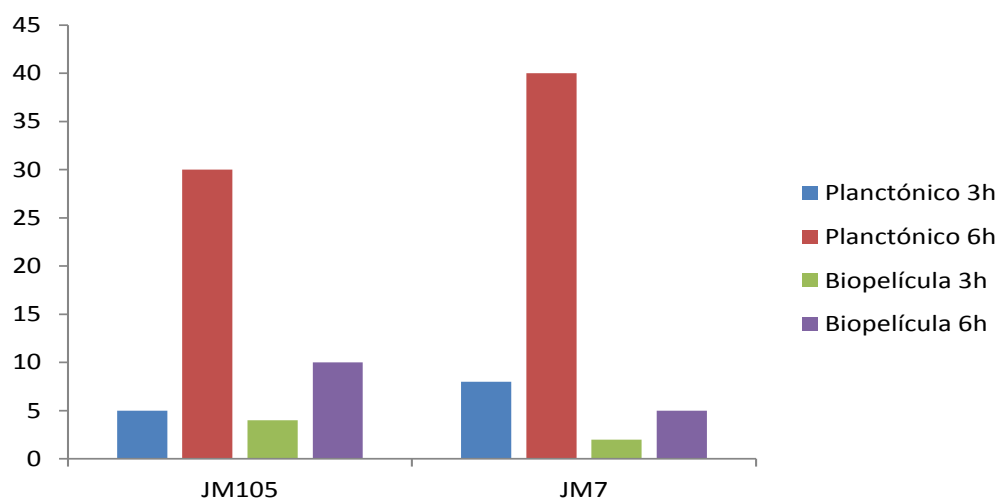


**Figura 51.** Niveles de expresión de IL-10 en monocitos/macrófagos obtenidos de voluntarios sanos tras 3 y 6 horas de exposición.

Asímismo podemos comprobar un gran incremento de la expresión de IL-12 en las 6 horas de incubación con respecto a los tiempos más iniciales. Este

aumento es especialmente llamativo en los inóculos de tipo planctónico de ambas cepas, donde pasa de 8 a 30 en la cepa normomutadora y de 10 a 45 en la cepa hipermutadora. La expresión observada con los inóculos de tipo biopelícula también se incrementa en las 6 horas de exposición (Figura 52).

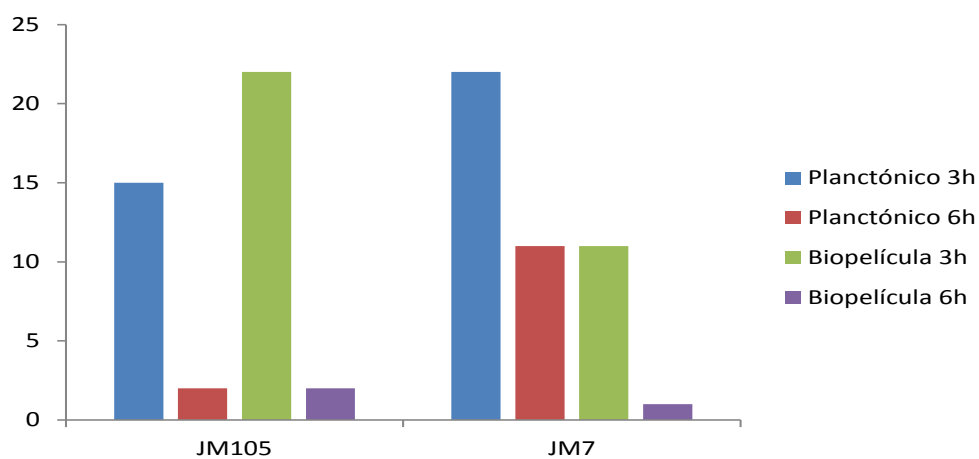
## IL-12



**Figura 52.** Niveles de expresión de IL-12 en monocitos/macrófagos obtenidos de voluntarios sanos tras 3 y 6 horas de exposición.

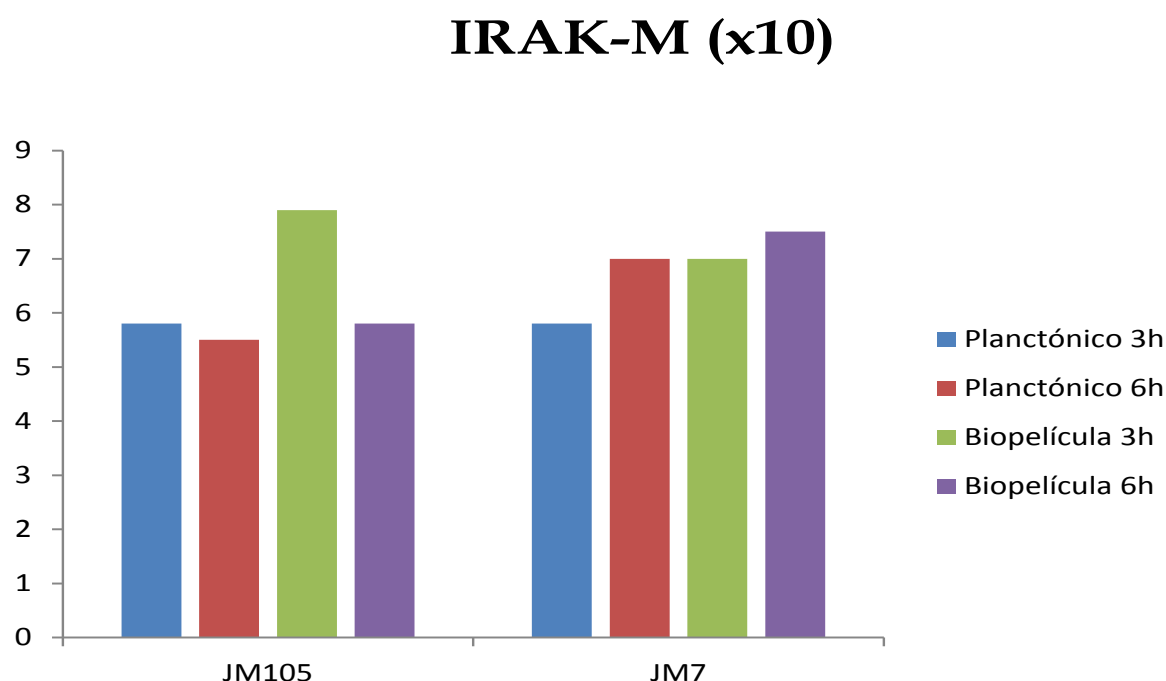
En el caso de  $\text{TNF}\alpha$  se observó una mayor expresión en las primeras horas de la exposición. (Figura 53).

## $\text{TNF}\alpha$



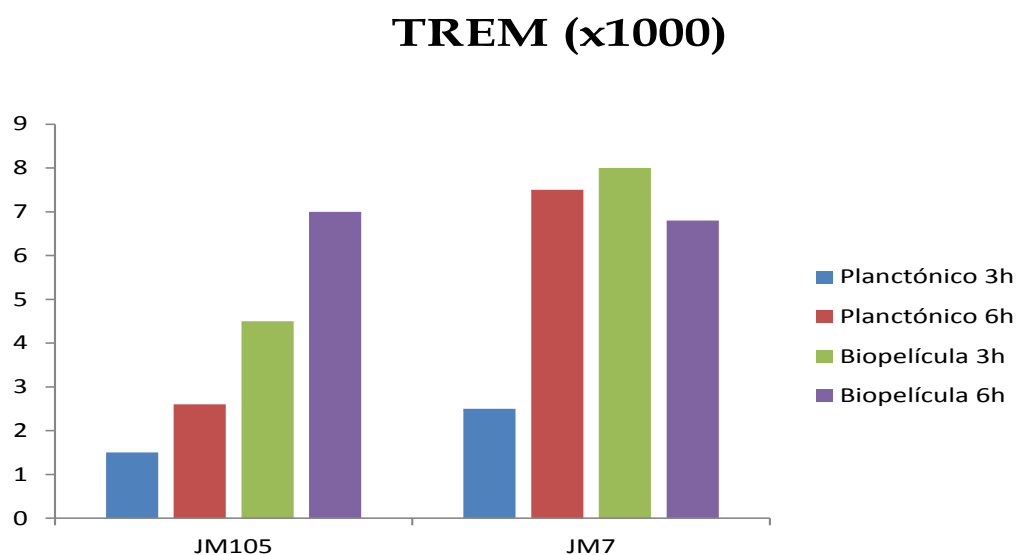
**Figura 53.** Niveles de expresión de  $\text{TNF}\alpha$  en monocitos/macrófagos obtenidos de voluntarios sanos tras 3 y 6 horas de exposición.

En el caso de IRAK-M se pudo apreciar una expresión homogénea en todos los puntos, si bien es más elevada en los inóculos de tipo biopelícula (Figura 54).



**Figura 54.** Niveles de expresión de IRAK-M en monocitos/macrófagos obtenidos de voluntarios sanos tras 3 y 6 horas de exposición.

En el caso de TREM1 se observó que los inóculos de tipo biopelícula promueven una mayor expresión de este mediador en un menor periodo de tiempo, mientras que en los inóculos planctónicos a las tres horas la expresión es menor. A las 6 horas del ensayo la expresión de los receptores era igual para planctónico y para biopelículas en la cepa mutadora, sin embargo para la no mutadora la diferencia de expresión seguía siendo igual que a las 3 horas (Figura 55).



**Figura 55.** Niveles de expresión de TREM en monocitos/macrófagos obtenidos de voluntarios sanos tras 3 y 6 horas de exposición.





## **Discusión**



El objetivo principal de esta tesis fue el conocimiento de la epidemiología de los aislados de *P. aeruginosa* de pacientes con FQ. Para ello se han estudiado las variables ecológicas de estos aislados, clasificándolos según su morfotipo, según el crecimiento planctónico o en biopelículas y finalmente según su tasa de mutación. Asimismo, se ha estudiado su estructura poblacional y dinámica de colonización y por último se ha analizado la respuesta del sistema inmune innato frente a estos aislados y sus diferentes formas de crecimiento.

Hasta hace unos años, el diagnóstico de la FQ se fundamentaba en la medición de los electrolitos en el sudor (prueba del sudor), en la detección de mutaciones en el gen CFTR o en la diferencia del potencial transnasal en aquellos pacientes que presentaban unas manifestaciones clínicas compatibles con la enfermedad. Con estos criterios y según los datos del registro de la Fundación Americana de FQ, el 90% de los enfermos eran diagnosticados antes de los 8 años de edad. El diagnóstico tardío en edades superiores a los 16 años, generalmente se asociaba con presentaciones clínicas más leves, con alteración funcional respiratoria leve, buen estado nutricional y menor prevalencia de colonización pulmonar por *P. aeruginosa* (Girón y cols., 2000, de Gracia y cols., 2002).

En la actualidad se desarrolla un programa de cribado neonatal que permite el diagnóstico precoz en el primer mes de vida. Con la implantación de este programa se ha conseguido un mejor conocimiento y control de la población afectada y a su vez la aplicación de protocolos de cuidados precoces (Dillard y cols., 2010; Bello y cols., 2010; Castellani y cols., 2009). En nuestro Hospital este programa se implantó en Enero de 2010.

La epidemiología es una disciplina que integra el estudio de la distribución de una enfermedad y los diferentes aspectos determinantes de su frecuencia. En este trabajo se han analizado los datos epidemiológicos de la colonización-infección broncopulmonar en los pacientes con FQ atendidos en nuestra Unidad de FQ, recogiendo los factores demográficos y la forma de presentación de esta colonización.

Esta parte consistió en un estudio retrospectivo y se analizaron dos periodos de tiempo separados por 10 años entre sí. Los pacientes incluidos en el primer periodo (Periodo A: 1993-1995) presentaron una media de edad de 16,9 años, y los del segundo periodo (Periodo B: 2002-2003) de 25,4 años. Este aumento de la edad podría ser debido a múltiples razones, entre las que se incluye los avances en la terapia digestiva, un

diagnóstico precoz de la enfermedad, la mejora de los tratamientos antimicrobianos y la implantación de protocolos de seguimiento clínico.

Otro punto importante que ha influido en el incremento de la supervivencia de estos pacientes, ha sido la creación y organización de las unidades multidisciplinarias de FQ constituidas por gastroenterólogos, neumólogos, nutricionistas, fisioterapeutas, psicólogos, trabajadores sociales, microbiólogos clínicos y radiólogos especializados en esta disciplina (Salcedo y cols., 1999; de Gracia y cols., 2002). Un 45% de los pacientes incluidos en el Periodo A formaron también parte del Periodo B. Sin embargo, las diferencias en la edad entre ambos periodos (16,9 periodo A y 24,6 periodo B) no pueden ser atribuidas a los pacientes del periodo A que continuaron en el B, sino a que casi todos los pacientes nuevos en el Periodo B eran adultos.

En este estudio se establecieron rangos de edad para poder comparar adecuadamente las diferencias en los patrones de colonización bacterianos. Los patrones de colonización fueron similares en ambos periodos, sin embargo los porcentajes fueron diferentes. Los dos patógenos mayoritarios fueron *P. aeruginosa* (69,1 y 51,81% Periodos A y B, respectivamente) y *S. aureus* (75,3 y 58,26% Periodos A y B, respectivamente). Todos los estudios en los que se analiza las tendencia en la colonización temporal publicados hasta ahora coinciden en la alta tasa de colonización bronquial por *P. aeruginosa*, describiéndose cifras del 60% en los pacientes de Norteamérica (Cystic Fibrosis Genetic Análisis Consortium, 1994). En otros países, estas cifras oscilan entre 44% en Nueva Zelanda (Wesley y cols., 1993), 48% en Canadá (Canadian Patient data; 1995) y 61% en Italia (Lambiase y cols., 2006).

En el caso de *S. aureus* se ha evidenciado un descenso en el porcentaje de pacientes colonizados. Sin embargo, en un estudio similar específico sobre la colonización por *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) realizado en nuestra Unidad, demostró un aumento en la prevalencia del 4,4% ( $p < 0,001$ ) de este microorganismo en el mismo periodo de tiempo (Molina y cols., 2008).

El aumento en la detección de determinados patógenos también se debe al uso de medios de crecimiento selectivo y a una mejora en la toma de las muestras (Vergison y cols., 2007). Así mismo, se ha descrito la existencia de nuevos morfotipos de crecimiento, como las denominadas variantes de colonia pequeñas (SCVs), que han sido asociadas con infecciones persistentes y resistencia a los antibióticos (Gilligan y cols., 1987). Estas variantes de crecimiento en *S. aureus* son equiparables a los diferentes

morfotipos de *P. aeruginosa*. Además, se ha documentado que la co-infección de *P. aeruginosa* y *S. aureus*, selecciona las variantes SCVs de *S. aureus* y a su vez confiere resistencia a aminoglicósidos (Hoffman y cols., 2006.).

Un aspecto poco resaltado hasta la fecha es la colonización por más de un patógeno (co-colonización). Este hecho ha sido señalado como de gran importancia desde el punto de vista ecológico y del mantenimiento de la persistencia de los microorganismos, incluso con la interacción de virus (Hofman y cols., 2006). En los datos de seguimiento de nuestros pacientes se han observado diferencias importantes en el patrón de colonización por más de un patógeno, concretamente la co-colonización de *H. influenzae* y *S. aureus*, que ha pasado de un 4% en el Periodo A a un 26% en el Periodo B.

Curiosamente, la tasa de colonización individual por *H. influenzae* no se modificó mientras que la de *S. aureus* disminuyó en el segundo periodo, por lo que no existe una explicación sencilla de este aumento de la co-colonización *H. influenzae*-*S. aureus*. Se podría especular que la vacuna frente a neumococo ha podido tener una repercusión en el aumento de la colonización por *H. influenzae*, pero en cualquier caso no existe una justificación de la asociación de ambos patógenos.

Diferentes estudios españoles señalan cifras de colonización por *P. aeruginosa* desde un 33% (García-Hernandez y cols., 2004) en pacientes con edad media de 15 años, hasta un 70% en pacientes con edad media de 23 años (de Gracia y cols., 2002). En nuestro centro, la disminución de casi el 20% de los pacientes colonizados en el Periodo A con respecto al Periodo B, podría atribuirse a la política antibiótica agresiva con fines de erradicación que se utiliza desde hace años. No obstante, se considera que la edad es el factor más importante que influye en la colonización pulmonar por *P. aeruginosa* (García-Hernández y cols, 2004), aunque también existen otros como el estado nutricional, el sexo femenino y la condición de homocigosis para la mutación  $\Delta F508$  (Maselli y cols., 2003).

En este estudio la edad media de los pacientes fue mayor en el segundo periodo (25 vs 17 años). Esta diferencia fue incluso mayor cuando se consideraron solo los pacientes colonizados por *P. aeruginosa*, cuya colonización aparece a partir de los 5 años en el Periodo A y a partir de los 10 años en el Periodo B. Este hecho es compatible con una primocolonización mas tardía, probablemente debida a un mejor manejo clínico de los pacientes.

El patógeno más importante en FQ y en el que se centra este estudio es *P. aeruginosa*, que se caracteriza por presentar diferentes morfotipos, siendo el mucoso el más problemático y difícil de tratar y/o erradicar. En una parte del estudio se ha propuesto analizar la ventaja selectiva entre las variantes mucosas y las no mucosas, ya que con el tiempo la variante que tiende a seleccionarse en todos los pacientes es la mucosa. En el Periodo A, en todos los rangos de edad, el morfotipo más representado fue el mucoso y el menos común fue el metálico. El 80% de los pacientes de menos de 20 años presentaban el morfotipo mucoso, que pasó a ser el 100% en los mayores de 21 años.

Durante el Periodo B en el rango de edad de 0-10 años el morfotipo mucoso no se detectó, mientras que se encontró presente en el 60% de los pacientes entre 11-20 años. A partir de los 21 años el 80% de los pacientes tenía morfotipo mucoso. Estos datos fueron ya descritos en 1969 por Robert G. Doggett el cual observó que el 70% de sus pacientes con FQ tenían aislamientos con morfotipo mucoso (Doggett, 1969).

El principal resultado obtenido con este trabajo fue la constatación de un retraso en la colonización por morfotipo mucoso en los niños de más corta edad y que en los mayores de 21 años disminuyó hasta el 80%. Nuevamente, esto puede deberse a los protocolos de erradicación de *P. aeruginosa* desde el momento de su aparición. Los pacientes colonizados durante los 5 primeros años de vida tienen un mayor riesgo de mortalidad (Sagel y cols., 2009).

En el estudio clasificamos a los pacientes en las categorías de no infectados, en estado de colonización/infección crónico (más de dos aislamientos al año) y en estado intermitente (aislamiento una sola vez al año).

En el Periodo A la mayoría de los pacientes no infectados fueron los de menor edad. A partir de los 35 años todos los pacientes fueron intermitentes y/o crónicos. Durante el Periodo B al igual que en el A, en las edades tempranas los pacientes no infectados son mayoría, y van disminuyendo con la edad. Sin embargo en este periodo a partir de los 35 años sigue existiendo un alto porcentaje de pacientes no infectados (45%).

Otro factor importante en la evolución de la colonización de *P. aeruginosa* es el patrón de sensibilidad antibiótica y la adquisición de mecanismos de resistencia. En los resultados no observamos diferencias en cuanto al patrón de sensibilidad a ticarcilina y

a ceftazidima en ambos períodos, mientras que el porcentaje de resistencia a imipenem (11% *vs* 21%) y tobramicina (12% *vs* 20%) se duplicó en el segundo período. Las diferencias más notables se observaron para amikacina (28% *vs* 57%) y ciprofloxacino (58% *vs* 23%). El incremento de las resistencias durante los años 90 a las quinolonas ha hecho que su utilización haya sido desplazada por antibióticos por vía inhalada como son la colistina y la tobramicina, esto podría explicar la menor tasa de resistencia a quinolonas en el segundo periodo.

En FQ el objetivo general del tratamiento antimicrobiano es la máxima reducción posible de *P. aeruginosa*, considerando que nunca se va a poder conseguir la erradicación total (Gibson y cols., 2003; Rajan y cols., 2002; Denton y cols., 1997; Döring y cols., 2000). Este objetivo implica el uso antibióticos bactericidas a dosis adecuadas, de manera que no se permita la selección de mecanismos de resistencia, especialmente mediante la aparición de mutaciones espontáneas.

Con los aminoglicósidos, como la amikacina, la muerte de los microorganismos se produce de forma rápida y proporcional a la dosis (den Hollander y cols., 1997; Mueller y cols., 2004).

En las fluoroquinolonas, como ciprofloxacino, la actividad bactericida es proporcional a la dosis pero paradójicamente dosis muy elevadas pueden resultar menos eficaces, ya que existe una “concentración optima bactericida” que no debe superarse (Phillips y cols., 1987).

Una vez analizadas las diferencias epidemiológicas en los dos periodos de tiempo, seleccionamos a 10 pacientes entre los años 2002-2006, fuera de los dos periodos estudiados. En concreto, nos propusimos analizar la epidemiología molecular de los aislados de *P. aeruginosa* obtenidos a partir de muestras respiratorias, principalmente esputos.

La aplicación de técnicas de epidemiología molecular en el análisis de la clonalidad de los aislados de *P. aeruginosa* debería ser una práctica habitual en el seguimiento microbiológico de los pacientes con FQ y su control epidemiológico. Así, en nuestro estudio, este análisis ha sido esencial para entender la dinámica de colonización por *P. aeruginosa*. Mientras que en diferentes pacientes se han obtenido clones sin relación genética entre ellos, se ha constatado la persistencia particular de un único clon mayoritario en cada paciente.

De la misma forma, es imprescindible la aplicación de estas técnicas para documentar el inicio de una colonización crónica en los individuos en los que fracase el tratamiento erradicador del primer aislado de *P. aeruginosa*, para demostrar colonizaciones cruzadas entre pacientes, o para identificar la presencia de clones hipertransmisibles (Speert y cols., 2002; Munck y cols., 2001; Saiman y cols., 2003; Spencker y cols., 2000; Johansen y cols., 1992; Folkesson y cols., 2012).

Estos estudios también nos han permitido constatar la existencia de diferentes morfotipos dentro de un mismo clon. Así de los 18 pulsotipos, en tres de ellos se han detectado aislados con al menos tres morfotipos diferentes. Otros seis pulsotipos presentaron aislamientos con dos morfotipos distintos, mientras que el resto tenía una presentación única.

Según los datos publicados en trabajos anteriores, la coexistencia simultánea de diferentes clones de *P. aeruginosa* es infrecuente (Burns y cols., 2001; Speert y cols., 2002; Aaron y cols., 2004; Spencker y cols., 2000), sin embargo en cuatro de nuestros pacientes se evidenció la coexistencia de varios clones en el mismo periodo de tiempo de seguimiento. El paciente 2 en el año 2002 tenía el pulsotipo L, mientras que en el año 2003 tenía los pulsotipos A, B y H. Los otros tres pacientes en los que se observó este fenómeno fueron los pacientes 7, 9 y 10.

La técnica molecular MLST nos ha permitido conocer la relación genética entre aislados de todo el mundo y de todos los orígenes, y así son muchos los estudios en los que se ha utilizado este sistema de tipado. Se ha publicado recientemente la estructura poblacional de aislados clínicos españoles de *P. aeruginosa* (García-Castillo y cols., 2011, Cabot y cols., 2012). En este trabajo se estudió la diversidad clonal de las cepas no sensibles a carbapenems recogidas a través de un estudio europeo de vigilancia de la resistencia (Nordmann y cols., 2011). En 175 aislados obtenidos de 16 hospitales españoles se detectaron 39 STs, siendo las más prevalentes ST175 (48 aislados de 10 hospitales), ST646 (16 aislados de 4 hospitales), ST532 (13 aislados de 3 hospitales) y ST111 (13 aislados de 7 hospitales).

Cuando aplicamos la técnica de MLST a los aislados de FQ detectamos 11 STs, dos de ellas que no habían sido previamente descritas (ST1045 y ST1046) y fueron anotadas en la base de datos.



Nuestros resultados son concordantes con los de otros autores donde se demuestra que distintos pulsotipos pueden corresponderse con iguales STs (Kidd y cols., 2011). Sin embargo, no detectamos ninguno de los clones que previamente habían sido asociados específicamente con FQ, como ST406 y ST497 en los pacientes de Holanda (van Mansfel y cols., 2009), o ST146-Liverpool y ST148-Manchester que infectan a la mayoría de los pacientes del Reino Unido y Canadá (Cheng y cols., 1996; Jones y cols., 2001; Aaron y cols., 2010). Los STs detectados en los pacientes de FQ españoles el ST 980 tiene un triple locus variant (TLV) con el clon holandés ST406 y con el clon Liverpool ST146. Esto significa que los tres pertenecen al mismo complejo clonal. También se observó que ST274 y ST395 estaban representados en las cepas clínicas aisladas de los hospitales españoles, del estudio COMPACT pero su frecuencia era muy baja (García-Castillo y cols., 2011).

Con este resultado se ha evidenciado una alta diversidad genética en las cepas de *P. aeruginosa* de pacientes de FQ, detectando STs que no habían sido previamente descritos. Esta observación sugiere una posible adquisición independiente, así como una escasa transmisión entre pacientes. Todo ello está sin duda favorecido por la política de segregación de pacientes en nuestra Unidad, donde se atienden a los pacientes colonizados por *P. aeruginosa* separados del resto que aún no han sido colonizados por este microorganismo. El origen de la colonización sigue siendo un tema de actualidad, y aunque muchos grupos sospechan la transmisión de paciente a paciente, lo cierto es que todavía esta teoría no está demostrada, siendo la adquisición medioambiental la hipótesis mas admitida (Mowat y cols., 2011; Saiman 2011, Aaron y cols., 2010; Festini y cols., 2010).

Cuando aplicamos la técnica de MLST a los aislados del paciente 1, pudimos comprobar que en tres aislados de los últimos años se habían producido dos mutaciones en el gen *mutL* que justificaban el cambio de ST. Así pues, este paciente presentaba una colonización crónica por ST242 que después coexistió con ST996, un “single locus variant” (García-Castillo y cols., 2012).

Aunque muchos trabajos han buscado la evolución de las cepas de *P. aeruginosa* en un contexto tan especial como es el de FQ (Cramer y cols., 2011; Bragonzi y cols., 2009; Ciofu y cols., 2010; Felizaini y cols., 2010; Yang y cols., 2011), esta es la primera vez que se detectaba este hecho *in vivo*. Se solicitó la revisión de la Historia Clínica de este paciente al Comité Ético de nuestro Hospital y observamos la alta

cantidad de antibióticos y de diferentes familias y clases que había recibido. En los últimos tres años se mantuvo con terapia antimicrobiana intravenosa durante 270 días al año. Este dato puede justificar el aumento de frecuencia de mutación detectada en las cepas de ST996, y la aparición de mutantes en el gen *mutL*.

Un dato curioso fue que las cepas de las dos STs presentaban campos pulsados idénticos, siendo la primera vez que se constataba y describiría este hecho (García-Castillo y cols., 2012). A pesar de que la técnica de PFGE se sigue considerando de referencia para establecer la relación genética entre cepas, la técnica de MLST muestra una mayor capacidad para determinar la estructura poblacional bacteriana. Sin embargo ambas técnicas son imprescindibles para conocer a fondo la diversidad genética.

Otra parte importante de este trabajo fue el estudio de sensibilidad antibiótica de estas cepas mediante tres métodos diferentes: Etest®, dilución en agar y microdilución. Esto se lleva a cabo para ciprofloxacino, tobramicina, imipenem y ceftazidima ya que son los antibióticos más utilizados en FQ, para las 42 cepas del estudio. Los resultados obtenidos con los tres métodos son discrepantes, siendo superiores los valores de CMI siempre con el método de microdilución, excepto para ceftazidima. Finalmente, la sensibilidad antibiótica se estudió mediante la técnica de microdilución, establecida como técnica de referencia por el comité americano del estudio de sensibilidad CLSI.

Cuando las bacterias crecen formando biopelículas suelen ser más resistentes a los antimicrobianos que en planctónico, pudiendo existir unas diferencias de varios órdenes de magnitud en las concentraciones mínimas inhibitorias. En nuestro trabajo, determinamos la sensibilidad antibiótica (8 antibióticos) en las cepas control ATCC27853, PAO1 y PAO1 $\Delta$ *mutS* mediante microdilución. El interés de estas cepas fue conocer el comportamiento de *P. aeruginosa* no procedentes de pacientes con FQ, y a la vez analizar las diferencias entre una cepa normomutadora y su isogénica hipermutadora. En condiciones planctónicas, los valores fueron muy similares en el caso de las cepas ATCC 27853 y PAO1, mientras que el caso de la cepa PAO1 $\Delta$ *mutS* los valores de sensibilidad fueron generalmente una dilución mayor que los de su isogénica, y en algún caso como tetraciclina, colistina y azitromicina los valores de sensibilidad no se vieron influenciados por su condición hipermutadora.

Cuando comparamos los valores de CMI con los de CMI-Biopelículas en las cepas normo e hipermutadoras, observamos que para ceftazidima, imipenem, tobramicina, ciprofloxacino, tetraciclina y colistina el valor de CMI-Biopelículas fue

muy superior. Este hecho se repitió también en las concentraciones bactericidas CMB y CMB-Biopelículas. Así pues, la concentración de antibiótico necesaria para producir la inhibición o la muerte de las bacterias en crecimiento en biopelícula fue mucho más elevada que la que se necesitó para las bacterias en crecimiento planctónico. Contrariamente, en el caso de la azitromicina, el valor de la CMI-biopelículas para la cepa hipermutadora fue tres diluciones (32→256 µg/ml) menor que el de la CMI.

En resumen, podemos decir que la cepa PAO1 tiene un comportamiento muy similar al de la cepa ATCC27853, existiendo diferencias con la variante hipermutadora, que en algunos casos es más resistente cuando crece en formación de biopelículas, pero que en otros es más sensible. Estos resultados se pueden explicar por la acción de los antibióticos frente a los microorganismos. Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (ceftazidima e imipenem) presentan una elevada actividad bactericida frente a los microorganismos en fase de crecimiento rápido, sin embargo reducen drásticamente su actividad sobre bacterias asociadas a biopelículas ya que crecen más lentamente que las células planctónicas debido a la limitación de acceso a nutrientes.

A diferencia de estos antimicrobianos, las fluoroquinolonas (levofloxacin y ciprofloxacino), son también antibióticos bactericidas sobre células en ausencia de crecimiento y por tanto capaces también de actuar frente a las biopelículas. La tobramicina es otro antibiótico bactericida que puede actuar sobre bacterias que no se encuentran en fase de división. Sin embargo, a diferencia de las fluoroquinolonas, pueden unirse al exopolisacárido de las biopelículas y su actuación es algo más lenta.

Por otra parte, existen numerosas evidencias que demuestran el papel potencial de los macrólidos (azitromicina) como agentes antiinflamatorios y sus efectos depresores en los factores de virulencia bacterianos. Frente a *P. aeruginosa*, azitromicina puede modular la producción de alginato e interferir en los sistemas de *quorum-sensing*, como ya se ha demostrado previamente, especialmente para los crecimiento en biopelículas (Skindersoe y cols., 2008; Starner y cols., 2008; Hoffmann y cols., 2007; Nalca y cols., 2006; Gillis y cols., 2005).

El objetivo del presente trabajo era estudiar las posibles diferencias entre cepas normo e hipermutadoras por una parte y por otra parte entre cepas con morfotipo mucoso y no mucoso. No se detectaron diferencias cuando se analizaron los valores de CMI y CMI-Biopelículas entre las categorías de cepas mucosas y no mucosas, ni tampoco entre las normo y las hipermutadoras.

Diferentes resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio han demostrado que los valores de CMI en las cepas hipermutadoras pueden variar según el tiempo de incubación, ya que se produciría un proceso de selección de aislados hipermutadores en presencia de antimicrobianos, situación que no produciría en las poblaciones normomutadoras (Oliver y cols., 2004). A su vez, la determinación de la frecuencia de mutación puede variar mucho según se utilice un inóculo planctónico o en biopelículas (García-Castillo y cols., 2011). El problema es que la mayor parte de los trabajos que han estudiado tanto la frecuencia de mutación como la sensibilidad antibiótica han utilizado inóculos en planctónico, que no se corresponden con la realidad del pulmón de un paciente con FQ donde las bacterias crecen formando biopelículas. Así pues, muchos de los resultados previamente publicados deberían ser nuevamente validados utilizando inóculos en biopelículas.

En nuestro trabajo se observó que las cepas que se habían clasificado como hipomutadoras en planctónico, tendían a comportarse como normo o incluso quedarse como hipomutadoras en biopelículas, mientras que las normo e hipermutadoras en planctónico disminuyen su frecuencia de mutación y se vuelven más hipomutadoras en biopelículas (García-Castillo y cols., 2011). En general podemos decir que en biopelículas las cepas tienden a unificar sus frecuencias de mutación en la categoría normomutadora.

Otro de los factores importantes a tener en cuenta es la forma en la que se crea la biopelícula. Existen muchas variantes metodológicas *in vitro* y en algunas de ellas existe un suministro continuo de agua y alimentos, e incluso un circuito de expulsión de detritus. En nuestra opinión, una biopelícula tal y como se presenta en la naturaleza carece o tiene restringido enormemente las fuentes de alimentación externa, y la mayor parte de las veces, las bacterias vivas se nutren de los ancestros muertos. Por ello, elegimos el modelo de formación en discos de nitrocelulosa que asegura unas condiciones más cercanas a las que ocurren sin la intervención del ser humano. Este modelo está actualmente aceptado por la comunidad científica.

Las bacterias pueden desarrollar resistencia a los antibióticos esencialmente mediante dos procesos: mutación y adquisición de elementos genéticos externos. Los propios antimicrobianos tienen un efecto mutagénico e inducen a la aparición de mutaciones en las bacterias. Por otra parte, de manera natural existen mutantes

resistentes en las poblaciones bacterianas, y este hecho es independiente de la presencia del antimicrobiano en el medio (Lipstich y Samore., 2002).

Nuestro grupo siempre ha estado muy interesado en ensayos de competición entre cepas isogénicas, como por ejemplo de *Escherichia coli* con betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y de selección con ceftazidima y cefepima en poblaciones de *Enterobacter cloacae* productores de AmpC betalactamasas (Baquero y Negri, 1997a,b; Blázquez y cols, 1995; Negri y Baquero, 1999). Estos estudios permitieron conocer que sólo es posible recuperar mutantes resistentes en un rango de concentraciones específicas que van desde la CMI de la población bacteriana sensible dominante hasta la CMI de la subpoblación más resistente. Bajo este prisma se establecieron por vez primera el concepto de las concentraciones selectivas y el de los compartimentos de selección (Baquero y Negri, 1997a,b).

Este concepto fue también aplicado a los macrólidos y al aumento de resistencia observada en *Streptococcus pneumoniae* cuando se correlacionaba con el consumo de macrólidos con una semivida prolongada (Baquero, 1999). Casi simultáneamente, Drlica (2001 y 2003b) observó que la selección de mutantes de *Mycobacterium tuberculosis* y *Staphylococcus aureus* resistentes a las fluoroquinolonas se producía exclusivamente en un rango específico de concentraciones.

La concentración inferior estaba cercana al valor de CMI mientras que la superior se situaba en el límite para el cual dejaban de aparecer mutantes resistentes en placas de selección. A este rango se le denominó ventana de selección (*mutant selection window*) y a la concentración que impide el crecimiento de los mutantes resistentes, concentración que previene la aparición de mutantes resistentes o CPM.

El valor de CPM quedó también definido como la CMI de los mutantes resistentes de primer escalón en una población bacteriana sensible. En trabajos posteriores se analizaron los valores de CPM de quinolonas en *S. pneumoniae* (Blondeau y cols., 2001), *E. coli* (Linde y Lehn, 2004) y *P. aeruginosa* (Cantón y cols., 2003; Hansen y cols., 2006).

Se utilizaron los valores obtenidos en estos trabajos para predecir los antimicrobianos que evitaban la aparición de mutantes resistentes (Zhao y Drlica., 2002; Epstein y cols., 2004).

En España, Sirvent y cols., analizaron los valores de CPM de diferentes fluoroquinolonas en una colección de aislados clínicos de *P. aeruginosa* procedentes de pacientes con infecciones nosocomiales, alguno de ellos con exposición previa a estos compuestos (Sirvent y cols., 2006). Aunque según el valor de CMI todos los aislados se consideraban sensibles a las fluoroquinolonas, los valores eran superiores a los que se encontraron en cepas de pacientes sin exposición antibiótica previa, indicando que parte de la población podría tener un mecanismo de resistencia de bajo nivel de expresión.

Con independencia de este hecho, los valores de CPM<sub>50</sub> y CPM<sub>90</sub> de ciprofloxacino (0,4 y 1,8 µg/ml) fueron más bajos que los de levofloxacino (1,4 y 2,7 µg/ml) y estos que los de gatifloxacino (2 y 2,8 µg/ml), ofloxacino (2,6 y 7,0 µg/ml) y moxifloxacino (3,4 y 8,5 µg/ml).

En el análisis detallado de los datos, los autores diferencian los valores de CPM según la procedencia de la cepa y la exposición previa de los pacientes a las fluoroquinolonas y a su vez establecen el cociente CMI/CPM y la relación de los valores de CPM con algunos parámetros farmacocinéticos (C<sub>máx</sub> en suero, concentración en macrófagos y epitelio pulmonar) obtenidos con dosis habituales de estos compuestos. De esta manera establecen conclusiones sobre el tratamiento con fluoroquinolonas en las infecciones por *P. aeruginosa*.

Los valores de CPM obtenidos por Sirvent y cols en 2006 son algo inferiores a los referidos por otros autores en *P. aeruginosa* (Canton y cols., 2003; Hansen y cols., 2006). Esta circunstancia podría ser explicada por diferentes factores: **a)** que la colección de cepas ensayadas responda de manera diferente a las fluoroquinolonas que las ensayadas por otros autores; **b)** que aun siendo el inóculo preparado por los autores elevado, el depósito con el replicador de Steers sobre las placas de agar con antimicrobianos (aproximadamente 4 ml) no asegure un número de células similar al estudiado por otros autores, y **c)** de la reflexión anterior también puede deducirse que en una población normal (sensible) de *P. aeruginosa* es posible encontrar de manera natural diferentes subpoblaciones resistentes que se inhiben por concentraciones distintas; los mutantes resistentes de bajo nivel serían mayoritarios en la subpoblación resistente (frecuencia de mutación elevada a concentraciones bajas) y sólo unas pocas células (frecuencia de mutación baja a concentraciones elevadas) tendrían un mecanismo de resistencia de alto nivel.

Existen estudios anteriores basados en la determinación del valor de CPM de la subpoblación con bajo nivel de resistencia, pero no de los mutantes con mayor nivel de resistencia. Para obtener esto último, es imprescindible que el inóculo inicial sea realmente elevado (Sirvent y cols., 2006). Esta hipótesis sólo podría demostrarse ensayando diferentes inóculos y analizando el mecanismo de resistencia de las subpoblaciones que sobreviven en las concentraciones previas a la del valor de la CPM. Hasta la fecha, en los trabajos realizados con *P. aeruginosa* en la determinación del valor de CPM no se ha contemplado esta posibilidad. Sin embargo es conocido que este microorganismo presenta con elevada frecuencia ( $<10^{-7}$ ), variantes resistentes (o menos sensibles) con aumento de la expresión de las bombas de expulsión, que se producen por la afectación de diferentes operones y genes reguladores y que los valores de CMI de las fluoroquinolonas afectadas no son muy elevados.

Por el contrario las mutaciones en el gen de la girasa y de la topoisomerasa IV aparecen con menor frecuencia ( $10^{-7}$ - $10^{-9}$ ) y los valores de CMI de las fluoroquinolonas en las cepas que presentan estas mutaciones son más elevadas que las anteriores (Macia y cols., 2006).

La determinación del valor de CPM y su aplicación clínica tiene dos aspectos conceptuales esenciales: a) el inóculo bacteriano y b) la propia definición de la CPM como concentración preventiva de primeros mutantes. Desde el punto de vista clínico, la utilización de un inóculo elevado ( $10^{10}$  UFC/ml) podría cuestionarse por el hecho de que son pocos los procesos en los que este valor se alcanza realmente. Con ello la extrapolación de los valores de CPM no serían reales en un escenario habitual de tratamiento antimicrobiano.

Sin embargo, la presencia de mutantes previamente seleccionados en una población bacteriana (es posible la selección *in vivo*) y la existencia de procesos crónicos que afectan a territorios compartimentalizados en los que el inóculo bacteriano y las concentraciones de antimicrobiano pueden ser diferentes en los distintos compartimentos, justifica la elección de un inóculo elevado.

Este sería el caso de las infecciones respiratorias con colonización crónica como el caso de los pacientes con FQ, pacientes con bronquitis crónica, pacientes con osteomielitis, pacientes con infecciones en el pie diabético e incluso en algunos pacientes con procesos agudos acompañados de una rápida progresión del número de microorganismos, como es el caso de pacientes ingresados en las unidades de medicina



intensiva y que desarrollan neumonías asociadas a ventilación mecánica (NAVM) (Tumkaya y cols., 2007).

Con respecto al segundo punto, se admite la determinación de CPM a partir de aislados con primeras mutaciones y por tanto definir la CPM como aquella que evite la aparición de mutantes con dobles mecanismos. Este aspecto tiene especial relevancia en el desarrollo de compuestos antimicrobianos capaces de evadir mecanismos de resistencia ya presentes pero que también eviten el desarrollo de nuevos mutantes (Zhao y cols., 2003).

Cuando se analizaron los resultados con las 42 cepas seleccionadas para nuestro estudio, los resultados fueron muy similares a los obtenidos con las cepas controles. Cabe destacar la diferencia en el ratio CPM/CMI para ceftazidima entre las cepas normomutadoras (134) y las hipermutadoras (441). En general en las variantes hipermutadoras se necesita una concentración más alta de antibiótico para prevenir la aparición de mutantes, excepto en el caso del imipenem.

En el presente trabajo, se han diseñado experimentos para determinar el valor de CPM utilizando un inóculo de crecimiento en biopelículas. No existe ningún antecedente en la bibliografía de experimentos similares, por lo que todos los resultados obtenidos en ellos son muy interesantes. Se ha tratado de unir dos conceptos diferentes que son el aumento de resistencia intrínseco a la formación de biopelículas con el de concentración preventiva de aparición de mutantes, y adaptarlo a la posible realidad de lo que ocurre en los pulmones de los pacientes con FQ.

A pesar de que el concepto de CPM lleva implícito una concentración específica de antibiótico, en el caso de las biopelículas podemos presuponer que esta concentración no va a ser uniforme en todas las partes de las biocapas. En nuestros experimentos hemos tratado de reproducir lo que puede ocurrir en las bacterias que están embebidas en la matriz de las biopelículas cuando llega un antibiótico y se puede producir la selección de mutantes.

Los resultados observados para todas las cepas ensayadas son similares en tobramicina, ciprofloxacino, e imipenem para la CPM-plactónica y en CPM-biopelícula. Sin embargo, en el caso de la ceftazidima hay un aumento considerable entre planctónico y biopelículas.



Las cepas de microorganismos aislados de pacientes con FQ suelen presentar tasas de mutación más altas de lo esperado (Prunier y cols., 2003; del Campo y cols., 2005; Oliver y cols., 2000). En esta característica influyen distintos fenómenos entre los que se encuentran la alta presión antibiótica y la compartimentalización del pulmón de estos pacientes. La consecuencia directa del aumento de la mutación es un aumento en la tasa de resistencia a los antimicrobianos.

En estadios basales, las cepas hipermutadoras no presentan resistencia a los antimicrobianos, pero su ventaja ecológica les permite desarrollar esta resistencia mediante mutaciones espontáneas en cualquier momento.

Para profundizar un poco más en este tema, desarrollamos un estudio para analizar la aparición de mutantes de primer nivel seleccionados en placas con concentraciones sub-CPM. Un dato relevante de este estudio fue que los mutantes a partir de las cepas hipermutadoras eran el doble de frecuentes que de los de las cepas normomutadoras. Estos resultados, nuevamente refuerzan la hipótesis de que la cepa hipermutadora no necesita acumular resistencia a los antimicrobianos, ya que puede desarrollarlas en cualquier momento. Por tanto, las cepas hipermutadoras suelen ser las más sensibles a los antimicrobianos.

La sobreexpresión de bombas de expulsión se traduce en la aparición de resistencia a quinolonas, mientras que clásicamente esta resistencia aparece tras mutaciones puntuales en los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* o *parE* de la región QRDR. Ambos mecanismos pueden existir de forma independiente o en combinación, pero para alcanzar *in vivo* niveles altos de resistencia a quinolonas es necesario la simultaneidad de ambos mecanismos (Ruiz, 2003; Bearden y Danziger, 2001, Piddoc y cols, 2000). Estos se producen con mayor facilidad a partir de las cepas hipermutadoras. También se ha asociado resistencia a ciprofloxacino y ácido nalidíxico a los transportadores MexABOprK de *P. aeruginosa* (Poole y cols, 1993).

Con el fin de estudiar la dinámica de competición entre las parejas de cepas isogénicas PAO y PAO $\Delta$ *mutS* y JM7 y JM105, se inocularon a diferentes concentraciones cada una de las cepas anteriores. Los resultados mostraron que las cepas hipermutadoras no tienen ninguna ventaja en competición frente a sus cepas isogénicas normomutadoras. Únicamente demostraron ventaja ecológica en presencia de antibiótico, en nuestro caso ciprofloxacino.

La finalidad de esta tesis fue ahondar en el conocimiento de la ventaja ecológica de las cepas hipermutadoras y mucosas frente a las normomutadoras y no mucosas. Para ello estudiamos los aislados por una parte y por otra parte intentamos elucidar la respuesta *in vivo* del huésped frente a la colonización. Así pues, diseñamos un experimento con monocitos/macrófagos sin diferenciar, y los enfrentamos a la pareja de cepas clínicas JM7 (hipermutadora y mucosa) y JM105 (normomutadora y no mucosa). Para realizar los experimentos de respuesta del sistema inmune innato contamos con la colaboración del laboratorio del Dr. Eduardo López-Collazo perteneciente al IDIPAZ (Instituto de investigación del hospital Universitario la Paz)

El objetivo fue medir las diferencias en la respuesta tras la estimulación del sistema inmune con la cepa normomutadora/no mucosa y la cepa hipermutadora/mucosa, pero nuevamente también nos planteamos analizar las posibles diferencias entre utilizar un inóculo en planctónico o en biofilm. Los resultados mostraron que la cepa JM7 hipermutadora y mucosa provocaba una mayor respuesta inflamatoria tras la exposición al sistema inmune innato, aunque no existen suficientes datos para detectar una diferencia significativa, ya que los experimentos únicamente se han realizado con los monocitos/macrófagos de dos voluntarios sanos.

En el paciente con FQ se ha descrito la existencia de un estado de tolerancia a endotoxinas, que se puede definir como un estado de sensibilidad reducida a las endotoxinas bacterianas (del Fresno y cols., 2010; del Campo y cols., 2011). Esta situación se debe a un fallo del sistema inmune innato local del pulmón que es incapaz de crear una respuesta inflamatoria adecuada en parte debida a la inmunosupresión de TREM-1 (Hartl y cols., 2007; del Fresno y cols., 2009). También se observó diferencias notables entre el inóculo en planctónico o en biopelículas, aunque serán necesarios más experimentos para explorar esta hipótesis.

## **Conclusiones**



1. El estudio epidemiológico ha evidenciado una mayor edad de los paciente atendidos por nuestra Unidad de fibrosis quística (FQ) en el último periodo analizado, lo que reflejaría un incremento de la vida media de los pacientes. Se observa una menor colonización por *Pseudomonas aeruginosa* en los pacientes de menor edad. Asimismo, se ha producido un aumento de la resistencia a amikacina y una disminución de la resistencia a ciprofloxacino, posiblemente debido a los cambios en las pautas de tratamiento.
2. En las cepas de *P. aeruginosa* de los pacientes con FQ de nuestra Unidad existe una elevada diversidad genética, sugiriendo una adquisición independiente y/o escasa transmisión de cepas entre pacientes.
3. En los aislados analizados, no existe relación entre los clones de FQ y los clones multirresistentes causantes de infección en los hospitales españoles. En nuestros pacientes tampoco se han detectado los clones internacionales previamente relacionados con FQ, a excepción de ST16 detectado en un solo paciente (paciente 6) y que se corresponde con un “doble locus variant” del clon holandés ST497.
4. En un paciente (paciente 1) con frecuentes exacerbaciones y tratamientos antibióticos se demostró la evolución “in vivo” por deriva génica de ST242→ST996 tras dos mutaciones nucleotídicas en el gen *mutL*, una de ellas no sinónima. Junto con esta evolución, se incrementó la frecuencia de mutación.
5. La frecuencia de mutación de las cepas estudiadas se incrementa con el tiempo de colonización, sin embargo existe una tendencia significativa hacia valores de normomutación cuando estos aislados crecen en biopelículas.
6. Se han constatado discrepancias en los valores de CMI según la metodología utilizada. También se han detectado considerables diferencias según el tipo de inóculo utilizado, siendo superiores los valores con un inóculo en biopelícula, a excepción de la azitromicina.
7. La determinación de los valores de CPM ha permitido conocer que las cepas hipermutadoras precisan una concentración más alta de antibiótico para prevenir la aparición de mutantes que en las normo/hipomutadoras.
8. La sobreexpresión de las bombas en mutante a concentraciones sub-CPM contribuyen de manera importante en la resistencia a las quinolonas en las cepas de FQ, pudiendo aparecer solas o en combinación con mutaciones en *gyrA*.

9. Los ensayos de crecimiento en competición de cepas control y aislados clínicos, demostraron que las cepas hipermutadoras y mucosas no tienen ventajas frente a sus isogénicas normomutadoras y no mucosas, salvo en presencia de antimicrobianos.
10. Se produce una mayor tendencia a producir un estado inflamatorio en el sistema inmune innato por las cepas hipermutadoras/mucosas frente a las normomutadoras/no mucosas. Igualmente, la respuesta inflamatoria es considerablemente menor cuando se utiliza un inóculo en biopelícula en vez de en planctónico.
11. Existe una evolución de las cepas de *P. aeruginosa* normomutadoras, sensibles a los antibióticos y no mucosas detectadas en los inicios de la enfermedad hacia cepas hipermutadoras, resistentes y mucosas. Esta evolución sería el resultado de la interacción del microorganismo y el sistema inmune del paciente, así como de los múltiples tratamientos antibióticos.

## **Bibliografía**





- Aaron SD, Ramotar K, Ferris W, Vandemheen K, Saginur R, Tullis E, Haase D, Kottachchi D, St Denis M, Chan F. Adult cystic fibrosis exacerbations and new strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Respir Crit Care Med*. **2004**; 169:811-5.
- Aaron SD, Vandemheen KL, Ramotar K, Giesbrecht-Lewis T, Tullis E, Freitag A, Paterson N, Jackson M, Lougheed MD, Dowson C, Kumar V, Ferris W, Chan F, Doucette S, Fergusson D. Infection with transmissible strains of *Pseudomonas aeruginosa* and clinical outcomes in adults with cystic fibrosis. *JAMA*. **2010**; 304:2145-53.
- Ballesteros S, Escobar H, Villaverde R, Elia M, Ojeda-Vargas M, Baquero F. Continious monitoring of antimicrobial resistance in cystic fibrosis patients H. Escobar, F. Baquero and L. Suarez. (eds). *Clinical ecology of Cystic Fibrosis*, Excerpta Medica, Amsterdam, **1993**; 63-72.
- Ballesteros S, Escobar H, Villaverde R, Negrodo P, Elia M, Ojeda Vargas M, Bauero F. H. Escobar, F. Baquero and L. Suarez. (eds). *Microbiological parameters and clinical evolution in cystic fibrosis*. *Clinical ecology of Cystic Fibrosis*, Excerpta Medica, Amsterdam, **1993**; 55-62.
- Baquero F, Negri MC. Selective compartments for resistant microorganisms in antibiotic gradients. *Bioessays*. **1997**; 19:731-6.
- Baquero F, Negri MC. Strategies to minimize the development of antibiotic resistance. *J Chemother* **1997**; 9:29-37.
- Baquero F. Evolving resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae*: a link with long-acting macrolide consumption? *J Chemother*. **1999**; 1:35-43.
- Bearden DT, Danziger LH. Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Pharmacotherapy*. **2001**; 21:224S-232S.
- Bello S, Ferguson C, Wallis R. Improvements to the newborn bloodspot screening service are required to meet national standards. *J Med Screen*. **2010**; 17:114-20.
- Benoit MR, Conant CG, Ionescu-Zanetti C, Schwartz M, Matin A. New device for high-throughput viability screening of flow biofilms. *Appl Environ Microbiol*. **2010**; 76:4136-42.
- Blazquez J, Morosini MI, Negri MC, Gonzalez-Leiza M, Baquero F. Single amino acid replacements at positions altered in naturally occurring extended-spectrum TEM beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. **1995**; 39:145-9.
- Blondeau JM, Zhao X, Hansen G, Drlica K. Mutant prevention concentrations of fluoroquinolones for clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**; 45:433-438.

- Bolister N, Basker M, Hodges NA, Marriott C.** The diffusion of beta-lactam antibiotics through mixed gels of cystic fibrosis-derived mucin and *Pseudomonas aeruginosa* alginate. *J Antimicrob Chemother.* **1991**; 27:285-93.
- Boyd A, Chakrabarty AM.** Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.* **1994**; 60:2355-9.
- Bragonzi A, Paroni M, Nonis A, Cramer N, Montanari S, Rejman J, Di Serio C, Döring G, Tümmler B.** *Pseudomonas aeruginosa* microevolution during cystic fibrosis lung infection establishes clones with adapted virulence. *Am J Respir Crit Care Med.* **2009**; 180:138-45.
- Brown MR, Barker J.** Unexplored reservoirs of pathogenic bacteria: protozoa and biofilms. *Trends Microbiol.* **1999**; 7:46-50.
- Burns JL, Gibson RL, McNamara S, Yim D, Emerson J, Rosenfeld M, Hiatt P, McCoy K, Castile R, Smith AL, Ramsey BW.** Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *J Infect Dis;* **2001**; 183:444-52.
- Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Domínguez MA, Gago JF, Juan C, Tubau F, Rodríguez C, Moyà B, Peña C, Martínez-Martínez L, Oliver A; on behalf of the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI).** Genetic Markers of Widespread Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* High-Risk Clones. *Antimicrob Agents Chemother.* **2012**; 56:6349-57.
- Canadian Patient Data Registry Nacional Report 1995.** Canadian Cystic Fibrosis Foundation
- Cantón R, Cobos N, de Gracia J, Baquero F, Honorato J, Gartner S, Alvarez A, Salcedo A, Oliver A, Garcia-Quetglas E;** (on behalf of the Spanish Consensus Group for Antimicrobial Therapy in the Cystic Fibrosis Patient). Antimicrobial therapy for pulmonary pathogenic colonisation and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect.* **2005**; 1:690-703.
- Cantón R, Morosini MI.** Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. *FEMS Microbiol.* **2011**; 35:977-91.
- Cantón R, Valdezate S, Vindel A, Sánchez Del Saz B, Maíz L, Baquero F.** Antimicrobial susceptibility profile of molecular typed cystic fibrosis *Stenotrophomonas maltophilia* isolates and differences with noncystic fibrosis isolates. *Pediatr Pulmonol.* **2003**; 35:99-107.
- Castellani C, Southern KW, Brownlee K, Dankert Roelse J, Duff A, Farrell M, Mehta A, Munck A, Pollitt R, Sermet-Gaudelus I, Wilcken B, Ballmann M, Corbetta C, de Monestrol I, Farrell P, Feilcke M, Férec C, Gartner S, Gaskin K, Hammermann J, Kashirskaya N, Loeber G, Macek M Jr, Mehta G, Reiman A, Rizzotti P, Sammon A, Sands D, Smyth A, Sommerburg O, Torresani T, Travert G, Vernooij A, Elborn S.** European best practice guidelines for cystic

- fibrosis neonatal screening. *J Cyst Fibros.* **2009**; 8:153-73.
- Ceri, H., M.E. Olson, C. Stremick, R.R. Read, D. Morck, and A. Buret.** The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J. Clin. Microbiol.* **1999**; 37:1771-1776.
- Cheng K, Smyth RL, Govan JR, Doherty C, Winstanley C, Denning N, Heaf DP, van Saene H, Hart CA.** Spread of b-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis clinic. *Lancet* **1996**; 348: 639–642.
- Chuanchuen R, Narasaki CT, Schweizer HP.** The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan. *J Bacteriol.* **2002**; 184:5036-44.
- Ciofu O, Mandsberg LF, Bjarnsholt T, Wassermann T, Høiby N.** Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during chronic lung infection of patients with cystic fibrosis: strong and weak mutators with heterogeneous genetic backgrounds emerge in mucA and/or lasR mutants. *Microbiology.* **2010**; 156:1108-19.
- Clifton IJ, Kastelik JA, Peckham DG, Hale A, Denton M, Etherington C, Conway SP.** Ten years of viral and non-bacterial serology in adults with cystic fibrosis. *Epidemiol Infect.* **2008**; 136:128-34.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM.** Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* **1995**; 49:711-45.
- Cramer N, Klockgether J, Wrasman K, Schmidt M, Davenport CF, Tümmler B.** Microevolution of the major common *Pseudomonas aeruginosa* clones C and PA14 in cystic fibrosis lungs. *Environ Microbiol.* **2011**;13:1690.
- Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG.** Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* **2004**; 42:5644-9.
- Davies DG, Chakrabarty AM, Geesey GG.** Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.* **1993**; 59:1181-6.
- Davies DG, Geesey GG.** Regulation of the alginate biosynthesis gene algC in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Appl Environ Microbiol.* **1995**; 61:860-7.
- Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP.** The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science.* **1998**; 280:295-8.
- De Gracia J, Alvarez A , Mata F, Guarner L , Vendrell M , Gadtner S , Cobos N.** Cystic Fibrosis in adults :study of 111 patients . *Med clin.* **2002**; 119:605-609.

- del Campo R, Morosini MI, de la Pedrosa EG, Fenoll A, Munoz-Almagro C, Maiz L, Baquero F, Canton R; Spanish Pneumococcal Infection Study Network. Population structure, antimicrobial resistance, and mutation frequencies of *Streptococcus pneumoniae* isolates from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*. **2005**; 43:2207-14.
- del Campo R, Martínez E, del Fresno C, Alenda R, Gómez-Piña V, Fernández-Ruiz I, Siliceo M, Jurado T, Toledano V, Arnalich F, García-Río F, López-Collazo E. Translocated LPS might cause endotoxin tolerance in circulating monocytes of cystic fibrosis patients. *PLoS One*. **2011**; 6:e29577.
- del Fresno C, García-Río F, Gómez-Piña V, Soares-Schanoski A, Fernández-Ruiz I, Jurado T, Kajiji T, Shu C, Marín E, Gutierrez del Arroyo A, Prados C, Arnalich F, Fuentes-Prior P, Biswas SK, López-Collazo E. Potent phagocytic activity with impaired antigen presentation identifying lipopolysaccharide-tolerant human monocytes: demonstration in isolated monocytes from cystic fibrosis patients. *J Immunol*. **2009**; 182:6494-507.
- del Fresno C, Gómez-Piña V, Lores V, Soares-Schanoski A, Fernández-Ruiz I, Rojo B, Alvarez-Sala R, Caballero-Garrido E, García F, Veliz T, Arnalich F, Fuentes-Prior P, García-Río F, López-Collazo E. Monocytes from cystic fibrosis patients are locked in an LPS tolerance state: down-regulation of TREM-1 as putative underlying mechanism. *PLoS One*. **2008**; 3:2667.
- den Hollander JG, Horrevorts AM, van Goor ML, Verbrugh HA, Mouton JW. Synergism between tobramycin and ceftazidime against a resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain, tested in an in vitro pharmacokinetic model. *Antimicrob Agents Chemother*. **1997**; 41:95-100.
- Denton M, Wilcox MH. Antimicrobial treatment of pulmonary colonization and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *J Antimicrob Chemother*. **1997**; 40:468-74.
- Dillard JP, Shen L, Robinson JD, Farrell PM. Parental information seeking following a positive newborn screening for cystic fibrosis. *J Health Commun*. **2010**; 15:880-94.
- Doggett RG. Incidence of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* from clinical sources. *Appl Microbiol*. **1969**; 18: 936-7.
- Doring G, Conway SP, Heijerman HG, Hodson ME, Hoiby N, Smyth A, Touw DJ. Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. *Eur Respir J*. **2000**; 16:749-67.
- Driffield K, Miller K, Bostock JM, O'Neill AJ, Chopra I. Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *J Antimicrob Chemother*. **2008**; 61:1053-6.
- Drlica K, Malik M. Fluoroquinolones: action and resistance. *Curr Top Med Chem*. **2003b**; 3:249-82.
- Drlica K, Zhao X, Blondeau JM, Hesje C. Low correlation between MIC and mutant

- prevention concentration. Antimicrob Agents Chemother. **2006**; 50:403-4.
- Drlica K.** The mutant selection window and antimicrobial resistance. J Antimicrob Chemother **2003a**; 52: 11-17.
- Drlica K.** Antibiotic resistance: can we beat the bugs? Drug Discov Today. **2001**; 6:714-715.
- Drlica K.** Mechanism of fluoroquinolone action. Curr Opin Microbiol. **1999**; 2:504-8.
- Emre S, Sungur A, Bilgiç S, Büyükpamukçu M, Günalp I, Özgüç M.** Loss of heterozygosity in the VNTR region of intron 1 of P53 in two retinoblastoma cases. Pediatr Hematol Oncol. **1996**; 13:253-6.
- Epstein BJ, Gums JG, Drlica K.** The changing face of antibiotic prescribing: the mutant selection window. Ann Pharmacother. **2004**; 38: 1675-82
- Farra A, Islam S, Strålfors A, Sörberg M, Wretling B.** Role of outer membrane protein OprD and penicillin-binding proteins in resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem and meropenem. Int J Antimicrob Agents. **2008**; 31:427-33.
- Feliziani S, Luján AM, Moyano AJ, Sola C, Bocco JL, Montanaro P, Canigia LF, Argaraña CE, Smania AM.** Mucoïdy, quorum sensing, mismatch repair and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis chronic airways infections. PLoS One. **2010**; 10:5: e12669.
- Fernández-Olmos A, García-Castillo M, Maiz L, Lamas A, Baquero F, Cantón R.** In vitro prevention of *Pseudomonas aeruginosa* early biofilm formation with antibiotics used in cystic fibrosis patients. Int J Antimicrob Agents. **2012**;40(2):173-6.
- Festini F, Taccetti G, Galici V, Neri S, Bisogni S, Ciofi D, Braggion C.** A 1-m distance is not safe for children with cystic fibrosis at risk for cross-infection with *Pseudomonas aeruginosa*. Am J Infect Control. **2010**; 38:244-5.
- Folkesson A, Jelsbak L, Yang L, Johansen HK, Ciofu O, Høiby N, Molin S.** Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. Nat Rev Microbiol. **2012**; 10:841-51.
- Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP.** Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. J Bacteriol. **1994**; 176:269-75.
- Gacesa P, Russel NJ.** The structure and properties of alginate: *Pseudomonas* infection and alginates :Biochemistry , genetics and pathology . P. Gacesa y N.J. Russel (eds) Chapman and Hall, Ltd., London . **1990a**.
- Gacesa P, Wusteman FS.** Plate assay for simultaneous detection of alginate lyases and determination of substrate specificity. Appl Environ Microbiol. **1990b**; 56:2265-7.
- García Hernández G, Antelo C, Maiz L, Girón RM, Salcedo A, Martínez Gimeno A, Martínez MT, Isabel Barrio M, Prados C.**

- Patients with cystic fibrosis managed at the cystic fibrosis units of Madrid: cross-sectional study of 387 subjects. *Med Clin (Barc)*. **2004**; 122:698-700.
- García-Castillo M, Del Campo R, Morosini MI, Riera E, Cabot G, Willems R, van Mansfeld R, Oliver A, Cantón R.** Wide Dispersion of ST175 Clone despite High Genetic Diversity of Carbapenem-Nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Strains in 16 Spanish Hospitals. *J Clin Microbiol*. **2011**; 49:2905-10.
- García-Castillo M, del Campo R, Baquero F, Morosini MI, Turrientes MC, Zamora J, Cantón R.** Stationary biofilm growth normalizes mutation frequencies and mutant prevention concentrations in *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect*. **2011**; 17:704-11.
- García-Castillo M, Máiz L, Morosini MI, Rodríguez-Baños M, Suarez L, Fernández-Olmos A, Baquero F, Cantón R, del Campo R.** Emergence of a mutL mutation causing multilocus sequence typing-pulsed-field gel electrophoresis discrepancy among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a cystic fibrosis patient. *J Clin Microbiol*. **2012**; 50:1777-8.
- Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW.** Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. **2003**; 168:918-51.
- Gilligan PH, Gage PA, Welch DF, Muszynski MJ, Wait KR.** Prevalence of thymidine-dependent *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. **1987**; 25:1258-61.
- Gilligan PH.** Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev*. **1991**; 4:35-51.
- Gillis RJ, White KG, Choi KH, Wagner VE, Schweizer HP, Iglewski BH.** Molecular basis of azithromycin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. **2005**; 49:3858-67.
- Girón Moreno Rosa María y Antonio Salcedo Posadas FIBROSIS QUÍSTICA.** Monografías NEUMO MADRID. VOLUMEN VIII / **2005**. Edita: ERGON.
- Girón RM, Javier de Gracia, Antonio Alvarez, Fernando Mata , Luisa Guarner, Montserrat Vendrell, Silvia Gadtner y Nicolás Cobos.** Fibrosis Quística del adulto estudio de 111 pacientes. *Med clin(Barc)*. El diagnostico de la fibrosis quística en el adulto. *Arch Bronconeumol* **2000**; 36: 3-6. **2002**; 119:605-9.
- Gordon CA, Hodges NA, Marriott C.** Antibiotic interaction and diffusion through alginate and exopolysaccharide of cystic fibrosis-derived *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. **1988**; 22:667-74.
- Gotoh N, Tsujimoto H, Poole K, Yamagishi J, Nishino T.** The outer membrane protein OprM of *Pseudomonas aeruginosa* is encoded by oprK of the mexA-mexB-oprK multidrug

- resistance operon. *Antimicrob Agents Chemother.* **1995**; 39:2567-9.
- Govan J.** TOBI: reducing the impact of pseudomonal infection. *Hosp Med.* **2002**; 63:421-5.
- Griese M, Muller I, Reinhardt D.** Eradication of initial *Pseudomonas aeruginosa* colonization in patients with cystic fibrosis. *Eur J Med Res.* **2002**; 7(2):79-80.
- Hancock RE.** Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis.* 1998; 27:S93-9.
- Hansen GT, Zhao X, Drlica K, Blondeau JM.** Mutant prevention concentration for ciprofloxacin and levofloxacin with *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents.* **2006**; 27(2):120-4.
- Hartl D, Latzin P, Hordijk P, Marcos V, Rudolph C, et al.** Cleavage of CXCR1 on neutrophils disables bacterial killing in cystic fibrosis lung disease. **2007**; 13: 1423–1430.
- Hirakata Y, Izumikawa K, Yamaguchi T, Takemura H, Tanaka H, Yoshida R, Matsuda J, Nakano M, Tomono K, Maesaki S, Kaku M, Yamada Y, Kamihira S, Kohno S.** Rapid detection and evaluation of clinical characteristics of emerging multiple-drug-resistant gram-negative rods carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP. *Antimicrob Agents Chemother.* **1998**; 42:2006-11.
- Hodson ME.** Treatment of cystic fibrosis in the adult. *Respiration.* **2000**; 67:595-607.
- Hoffman LR, Déziel E, D'Argenio DA, Lépine F, Emerson J, McNamara S, Gibson, RL, Ramsey BW, Miller SI.** Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2006**; 103:19890-5.
- Hoffmann N, Lee B, Hentzer M, Rasmussen TB, Song Z, Johansen HK, Givskov M, Høiby N.** Azithromycin blocks quorum sensing and alginate polymer formation and increases the sensitivity to serum and stationary-growth-phase killing of *Pseudomonas aeruginosa* and attenuates chronic *P. aeruginosa* lung infection in Cftr(-/-) mice. *Antimicrob Agents Chemother.* **2007**; 51:3677-87.
- Hogardt M, Schubert S, Adler K, Götzfried M, Heesemann J.** Sequence variability and functional analysis of MutS of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates. *Int J Med Microbiol.* **2006**; 296:313-20.
- Holloway BW.** Genetics of *Pseudomonas*. *Bacteriol Rev.* **1969**; 33:419-43.
- Ishida H, Ishida Y, Kurosaka Y, Otani T, Sato K, Kobayashi H.** In vitro and in vivo activities of levofloxacin against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **1998**; 42:1641-5.
- Jacquot J, Tabary O, Clement A.** Hyperinflammation in airways of cystic fibrosis

- patients: what's new? *Expert Rev Mol Diagn.* **2008a**; 8:359-63.
- Jacquot J, Tabary O, Le Rouzic P, Clement A.** Airway epithelial cell inflammatory signalling in cystic fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol.* **2008b**; 40:1703-15.
- Jalal S, Ciofu O, Hoiby N, Gotoh N, Wretling B.** Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother.* **2000**; 44:710-2.
- Johansen HK, Høiby N.** Seasonal onset of initial colonisation and chronic infection with *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis in Denmark. *Thorax.* **1992**; 47:109-11.
- Jones AM, Govan JR, Doherty CJ, Dodd ME, Isalska BJ, Stanbridge TN, Webb AK.** Spread of a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* in an adult cystic fibrosis clinic. *Lancet* **2001**; 358:557-558.
- Kidd TJ, Grimwood K, Ramsay KA, Rainey PB, Bell SC.** Comparison of three molecular techniques for typing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in sputum samples from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* **2011**; 49:263-8.
- Koch C., N Hoiby .** Pathogenesis of cystic fibrosis. *Lancet*, **1993**; 341:1065-1069.
- Kohler T, Michea-Hamzehpour M, Henze U, Gotoh N, Curty LK, Pechere JC.** Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* **1997**; 23:345-54.
- Lipsitch M, Samore MH.** Antimicrobial use and antimicrobial resistance: a population perspective. *Emerg Infect Dis.* **2002**; 347-54
- Livermore DM, Woodford N.** Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr Opin Microbiol.* **2000**; 3:489-95.
- Livermore, D.M.** Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin. Infect. Dis.* **2002**. 34: 634-640.
- Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB.** Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol.* **2002**; 15:194-222.
- Macia MD, Blanquer D, Togores B, Sauleda J, Perez JL, Oliver A.** Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrob Agents Chemother.* **2005**; 49:3382-6.
- Macia MD, Borrell N, Segura M, Gomez C, Perez JL, Oliver A. Efficacy and potential for resistance selection of antipseudomonal treatments in a mouse model of lung infection by hypermutable *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2006**; 50:975-83.
- Mandell, Bennett, Dolin** 5<sup>a</sup> ed. Enfermedades infecciosas (principios y práctica). **2010**. Capitulo 207: 2803



- Maselli JH, Sontag MK, Norris JM, MacKenzie T, Wagener JS, Accurso FJ.** Risk factors for initial acquisition of *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis identified by newborn screening. *Pediatr Pulmonol.* **2003**; 35:257-62.
- Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T.** Contribution of the MexX-MexY-oprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2000**; 44:224-26.
- Matsen JM, Bosso JA.** The use of aztreonam in the cystic fibrosis patient. *Pediatr Infect Dis J.* **1989**; 8:S117-9.
- McCaffery K, Olver RE, Franklin M, Mukhopadhyay S.** Systematic review of antistaphylococcal antibiotic therapy in cystic fibrosis. *Thorax.* **1999**; 54:380-3.
- Mena A, Maciá MD, Borrell N, Moya B, de Francisco T, Pérez JL, Oliver A.** Inactivation of the mismatch repair system in *Pseudomonas aeruginosa* attenuates virulence but favors persistence of oropharyngeal colonization in cystic fibrosis mice. *J Bacteriol.* **2007**; 189:3665-8.
- Mine T, Morita Y, Kataoka A, Mizushima T, Tsuchiya T.** Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **1999**; 43:415-7.
- Molina A, Del Campo R, Máiz L, Morosini MI, Lamas A, Baquero F, Cantón R.** High prevalence in cystic fibrosis patients of multiresistant hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST228-SCCmecI capable of biofilm formation *J Antimicrob Chemother.* **2008**; 62:961-7.
- Montanari S, Oliver A, Salerno P, Mena A, Bertoni G, Tümmler B, Cariani L, Conese M, Döring G, Bragonzi A.** Biological cost of hypermutation in *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with cystic fibrosis. *Microbiology.* **2007**; 153:1445-54.
- Montgomery MJ, Beringer PM, Aminimanizani A, Louie SG, Shapiro BJ, Jelliffe R, Gill MA.** Population pharmacokinetics and use of Monte Carlo simulation to evaluate currently recommended dosing regimens of ciprofloxacin in adult patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother.* **2001**; 5:3468-73.
- Morrison AJ Jr, Wenzel RP.** Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis.* **1984**; 6:S627-42.
- Moskowitz SM, Foster JM, Emerson J, Burns JL.** Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* **2004**; 42:1915-22.
- Mowat E, Paterson S, Fothergill JL, Wright EA, Ledson MJ, Walshaw MJ, Brockhurst MA, Winstanley C.** *Pseudomonas aeruginosa* Population Diversity and Turnover in Cystic Fibrosis Chronic Infections. *Am J Respir Crit Care Med.* **2011**; 183:1674-9.

- Moyano AJ, Luján AM, Argaraña CE, Smania AM.** MutS deficiency and activity of the error-prone DNA polymerase IV are crucial for determining mucA as the main target for mucoid conversion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* **2007**; 64:547-59.
- Mueller M, de la Peña A, Derendorf H.** Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: kill curves versus MIC. *Antimicrob Agents Chemother.* **2004**; 48:369-77.
- Munck A, Bonacorsi S, Mariani-Kurkdjian P, Lebourgeois M, Gérardin M, Brahimi N, Navarro J, Bingen E.** Genotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* strains recovered from patients with cystic fibrosis after initial and subsequent colonization. *Pediatr Pulmonol.* **2001**; 32:288-92.
- Nalca Y, Jänsch L, Bredenbruch F, Geffers R, Buer J, Häussler** Quorum-sensing antagonistic activities of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: a global approach.. *Antimicrob Agents Chemother.* **2006**;50:1680-8.
- Nichols WW, Dorrington SM, Slack MP, Walmsley HL.** Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. *Antimicrob Agents Chemother.* **1988**; 32(4):518-23.
- Nikaido H.** Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *J Biol Chem.* **1994a**; 269:3905-8.
- Nikaido H.** Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science.* **1994b**; 264:382-8.
- Nordmann P, Picazo JJ, Mutters R, Korten V, Quintana A, Laeuffer JM, Seak JC, Flamm RK, Morrissey I.** COMPACT study group. Comparative activity of carbapenem testing: the COMPACT study. *J Antimicrob Chemother.* **2011**; 66:1070-8.
- Oliver A, Canton R, Campo P, Baquero F, Blázquez J.** High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science.* **2000**; 288:1251-4.
- Oliver A, Levin BR, Juan C, Baquero F, Blázquez J.** Hypermutation and the preexistence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants: implications for susceptibility testing and treatment of chronic infections. *Antimicrob Agents Chemother.* **2004**; 48:4226-33.
- O'Toole GA, Kolter R.** Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol.* **1998**;30:295-304.
- Phillips I, Culebras E, Moreno F, Baquero F.** Induction of the SOS response by new 4-quinolones. *J Antimicrob Chemother.* **1987**; 20:631-8.
- Piddock LJ, White DG, Gensberg K, Pumbwe L, Griggs DJ.** Evidence for an efflux pump mediating multiple antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2000**; 44:3118-21

- Poirel L, Rotimi VO, Mokaddas EM, Karim A, Nordmann P.** VEB-1-like extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*, Kuwait. *Emerg Infect Dis.* **2001**; 7:468-70.
- Poole K, Gotoh N, Tsujimoto H, Zhao Q, Wada A, Yamasaki T, Neshat S, Yamagishi J, Li XZ, Nishino T.** Overexpression of the mexC-mexD-oprJ efflux operon in nfxB-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* **1996**; 21:713-24.
- Poole K, Krebes K, McNally C, Neshat S.** Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J Bacteriol.* **1993**;175:7363-72.
- Poole K.** Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-positive bacteria and the mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* **2000**; 44:2595-9.
- Poole K.** Overcoming antimicrobial resistance by targeting resistance mechanisms. *J Pharm Pharmacol.* **2001**; 53:283-94.
- Prunier AL, Malbruny B, Laurans M, Brouard J, Duhamel JF, Leclercq R.** High rate of macrolide resistance in *Staphylococcus aureus* strains from patients with cystic fibrosis reveals high proportions of hypermutable strains. *J Infect Dis.* **2003**; 187:1709-16.
- Rajan S, Saiman L.** Pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *Semin Respir Infect.* **2002**;17(1):47-56.
- Ramsey BW.** Management of pulmonary disease in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med.* 1996; 335(3):179-88.
- Ratjen F, Comes G, Paul K, Posselt HG, Wagner TO, Harms K.** German Board of the European Registry for Cystic Fibrosis (ERCF). Effect of continuous antistaphylococcal therapy on the rate of *P. Aeruginosa* acquisition in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* **2001a**; 31:13-6.
- Ratjen F.** Changes in strategies for optimal antibacterial therapy in cystic fibrosis. *Int J Antimicrob Agents.* **2001b**; 17:93-6.
- Riera E, Cabot G, Mulet X, García-Castillo M, del Campo R, Juan C, Cantón R, Oliver A.** *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem. *J Antimicrob Chemother.* **2011**; 66:2022-7.
- Riordan JR, Alon N, Grzelczak Z, Dubel S, Sun S.** The CF gene product as a member of a membrane transporter (TM6-NBF) superfamily. *Adv Exp Med Biol* **1991**; 290:19-29.
- Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF.** A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1998**; 95:588-93.
- Rosenfeld M, Gibson RL, McNamara S, Emerson J, Burns JL, Castile R, Hiatt P, McCoy K, Wilson CB, Inglis A, Smith A, Martin TR, Ramsey BW.** Early pulmonary infection, inflammation, and clinical

outcomes in infants with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* **2001**; 32:356-66.

**Rosenfeld M, Ramsey BW, Gibson RL.** *Pseudomonas* acquisition in young patients with cystic fibrosis: pathophysiology, diagnosis, and management. *Curr Opin Pulm Med.* **2003**; 9:492-7.

**Ruiz J.** Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother.* **2003**; 51:1109-17.

**Sagel SD, Gibson RL, Emerson J, McNamara S, Burns JL, Wagener JS, Ramsey BW.** Inhaled Tobramycin in Young Children Study Group; Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics Development Network. Impact of *Pseudomonas* and *Staphylococcus* infection on inflammation and clinical status in young children with cystic fibrosis. *J Pediatr.* **2009**; 154:183-8.

**Saiman L, Siegel J.** Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference on Infection Control Participants. Infection control recommendations for patients with cystic fibrosis: Microbiology, important pathogens, and infection control practices to prevent patient-to-patient transmission. *Am J Infect Control.* **2003**; 5:S6-52.

**Saiman L.** Infection prevention and control in cystic fibrosis. *Curr Opin Infect Dis.* **2011**; 24:390-5.

**Salcedo A.** Unidades de Fibrosis Quística: organización y funcionamiento. *An Esp Ped* **1999**; 133:59-61.

**Schwiebert EM, Benos DJ, Egan ME, Stutts MJ, Guggino WB.** CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiol Rev.* **1999**; 79:S145-66.

**Sharif O, Knapp S.** From expression to signaling: roles of TREM-1 and TREM-2 in innate immunity and bacterial infection. *Immunobiology.* **2008**; 213:701-13.

**Siliceo M, Jurado T, Toledano V, Arnalich F, García-Río F, López-Collazo E.** Translocated LPS might cause endotoxin tolerance in circulating monocytes of cystic fibrosis patients. *PLoS One.* **2011**; 6:e29577.

**Simmons WL, Bolland JR, Daubenspeck JM, Dybvig K.** A stochastic mechanism for biofilm formation by *Mycoplasma pulmonis*. *J Bacteriol.* **2007**; 189:1905-13.

**Sirvent E, Ruiz M, Rodríguez JC, Royo G.** Study investigating the activity of several fluoroquinolones against *Pseudomonas aeruginosa* using the mutant prevention concentration. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **2006**; 24:603-7.

**Skindersoe ME, Alhede M, Phipps R, Yang L, Jensen PO, Rasmussen TB, Bjarnsholt T, Tolker-Nielsen T, Høiby N, Givskov M.** Effects of antibiotics on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2008**; 52:3648-63.

**Smith JJ, Travis SM, Greenberg EP, Welsh MJ.** Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell.* **1996**; 85:229-36.

- Smyth A, Walters S.** Prophylactic antibiotics for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev.* **2001**; 3:CD001912.
- Speert DP, Campbell ME, Henry DA, Milner R, Taha F, Gravelle A, Davidson AG, Wong LT, Mahenthiralingam E.** Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis in British Columbia, Canada. *Am J Respir Crit Care Med.* **2002**; 166:988-93.
- Spencer FB, Haupt S, Claros MC, Walter S, Lietz T, Schille R, Rodloff AC.** Epidemiologic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Infect.* **2000**; 6:600-7.
- Starner TD, Shrout JD, Parsek MR, Appelbaum PC, Kim G.** Subinhibitory concentrations of azithromycin decrease nontypeable *Haemophilus influenza* biofilm formation and diminish established biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* **2008**; 52:137-45.
- Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warren P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S, Olson MV.** Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature.* **2000**; 406:959-64.
- Tumkaya M, Atis S, Ozge C, Delialioglu N, Polat G, Kanik A.** Relationship between airway colonization, inflammation and exacerbation frequency in COPD. *Respir Med.* **2007**; 101:729-37.
- van Bortel RA, van de Klundert JA.** Expression of the *Pseudomonas aeruginosa* gentamicin resistance gene *aacC3* in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* **1998**; 42(12):3173-8.
- van Mansfeld R, Willems R, Brimicombe R, Heijerman H, van Berkhout FT, Wolfs T, van der Ent C, Bonten M.** *Pseudomonas aeruginosa* genotype prevalence in Dutch cystic fibrosis patients and age dependency of colonization by various *P. aeruginosa* sequence types. *J Clin Microbiol.* **2009**; 47:4096-101.
- Vergison A, Denis O, Deplano A, Casimir G, Claeys G, DeBaets F, DeBoeck K, Douat N, Franckx H, Gigi J, Ieven M, Knoop C, Lebeque P, Lebrun F, Malfroot A, Paucquay F, Pierard D, Van Eldere J, Struelens MJ.** National survey of molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* colonization in Belgian cystic fibrosis patients. *J Antimicrob Chemother.* **2007**; 59:893-9.
- Welsh MJ, Smith AE.** Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell.* **1993**; 73:1251-4.
- Wesley A, Dawson K, Hewitt C, Kerr A.** Clinical features of individuals with cystic fibrosis in New Zealand. *N Z Med J.* **1993**; 106:28-30.
- Wolter DJ, Khalaf N, Robledo IE, Vázquez GJ, Santé MI, Aquino EE, Goering RV,**

- Hanson ND.** Surveillance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Puerto Rican Medical Center Hospitals: dissemination of KPC and IMP-18 beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* **2009**; 53:1660-4.
- Wong K, Roberts MC, Owens L, Fife M, Smith AL.** Selective media for the quantitation of bacteria in cystic fibrosis sputum. *J Med Microbiol.* **1984**; 17:113-9.
- Wright TW, Johnston CJ, Harmsen AG, Finkelstein JN.** Chemokine gene expression during *Pneumocystis carinii*-driven pulmonary inflammation. *Infect Immun.* **1999**; 67(7):3452-60.
- Xu C, Li M, Huang Y, Zhang Z, Bian Z, Song S.** Involvement of quorum-sensing in biosynthesis of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas aeruginosa*. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* **2011**; 51:769-75.
- Yang L, Jelsbak L, Marvig RL, Damkiær S, Workman CT, Rau MH, Hansen SK, Folkesson A, Johansen HK, Ciofu O, Høiby N, Sommer MO, Molin S.** Evolutionary dynamics of bacteria in a human host environment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2011**; 108:7481-6.
- Zhao X, Drlica K.** Restricting the selection of antibiotic-resistant mutant bacteria: measurement and potential use of the mutant selection window. *J Infect Dis* **2002**; 185: 561-565.
- Zhao X, Eisner W, Perl-Rosenthal N, Kreiswirth B, Drlica K.** Mutant prevention concentration of garenoxacin (BMS-284756) for ciprofloxacin-susceptible or - resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2003**; 47:1023-7.

## **Anexos**

